



(51) МПК

*C07K 19/00* (2006.01)*C07K 16/18* (2006.01)*A61K 39/00* (2006.01)*A61P 43/00* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**(21), (22) Заявка: **2005120239/13**, 13.11.2004(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**13.11.2004**(30) Конвенционный приоритет:  
**13.11.2003 KR 10-2003-0080299**(43) Дата публикации заявки: **20.04.2006**(45) Опубликовано: **20.04.2009** Бюл. № 11(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: **US 6,620,413 B1**, 16.09.2003. **WO 0103737**  
**A1**, 18.01.2001. **US 6,340,742 A1**, 22.01.2002. **US**  
**20020081664 A1**, 27.06.2002. **RU 2178307 C2**,  
**20.01.2002**.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную  
фазу: **27.06.2005**(86) Заявка РСТ:  
**KR 2004/002945** (13.11.2004)(87) Публикация РСТ:  
**WO 2005/047337** (26.05.2005)Адрес для переписки:  
**129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517**

(72) Автор(ы):

**КИМ Янг Мин (KR),  
СОНГ Дае Хае (KR),  
ДЗУНГ Сунг Йоуб (KR),  
КИМ Чанг Хван (KR),  
ЧОИ Ин Янг (KR),  
КВОН Се Чанг (KR),  
ЛИ Гван Сун (KR)**

(73) Патентообладатель(и):

**ХАНМИ ФАРМ. ИНД. КО., ЛТД. (KR)****(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ Fc-ОБЛАСТЬ  
ИММУНОГЛОБУЛИНА В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ**

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и иммунологии. Описан способ увеличения продолжительности действия физиологически активного полипептида *in vivo*. Способ основан на том, что физиологически активный полипептид конъюгируют с Fc-фрагментом иммуноглобулина посредством полиэтиленгликоля. Использование изобретения, по сравнению с нативным

физиологически активным полипептидом, обеспечивает повышенную физиологическую активность *in vivo* конструкции и/или увеличение времени полужизни в сыворотке физиологически активного полипептида с минимальным риском индуцирования нежелательных иммунных ответов. Это может найти применение при изготовлении различных полипептидных лекарственных препаратов пролонгированного действия. 10 з.п. ф-лы, 10 табл., 18 ил.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*C07K 19/00* (2006.01)*C07K 16/18* (2006.01)*A61K 39/00* (2006.01)*A61P 43/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2005120239/13**, 13.11.2004(24) Effective date for property rights:  
**13.11.2004**(30) Priority:  
**13.11.2003 KR 10-2003-0080299**(43) Application published: **20.04.2006**(45) Date of publication: **20.04.2009 Bull. 11**(85) Commencement of national phase: **27.06.2005**(86) PCT application:  
**KR 2004/002945 (13.11.2004)**(87) PCT publication:  
**WO 2005/047337 (26.05.2005)**

Mail address:  
**129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO  
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",  
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**KIM Jang Min (KR),  
SONG Dae Khae (KR),  
DZUNG Sung Joub (KR),  
KIM Chang Khvan (KR),  
ChOI In Jang (KR),  
KVON Se Chang (KR),  
LI Gvan Sun (KR)**

(73) Proprietor(s):

**KhANMI FARM. IND. KO., LTD. (KR)****(54) PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING Fc-REGION OF IMMUNOGLOBULIN AS CARRIER**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method of augmentation of duration of action of physiologically active polypeptide in vivo is described. Physiologically active polypeptide is conjugated with Fc fragment of immunoglobulin by means of PEG. Invention use, in comparison with native physiologically active polypeptide, provides the raised physiological

activity in vivo designs and-or augmentation of time of a semilife in Serum of physiologically active polypeptide with the minimum risk of induction of undesirable immune responses.

EFFECT: possibility of application of bond at manufacturing of various polypeptides medicinal preparations of the prolonged action.

11 cl, 18 dwg, 8 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новому использованию Fc-фрагмента иммуноглобулина. Более конкретно, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей Fc-фрагмент иммуноглобулина в качестве носителя, и к способу увеличения продолжительности *in vivo* действия лекарственного средства, связанного с Fc-фрагментом иммуноглобулина.

Предшествующий уровень техники

Ранее многими фармакологами и химиками были предприняты попытки химического изменения и/или модификации *in vivo* активности природных физиологически активных молекул. Эти попытки были направлены, главным образом, на усиление *in vivo* активности или увеличение времени действия физиологически активных молекул, а также на снижение токсичности, устранение или уменьшение побочных эффектов или на модификацию специфической физиологической активности физиологически активных веществ. Если физиологически активное вещество является химически модифицированным, то в большинстве случаев оно теряет некоторую или большую часть своей физиологической активности. Однако в некоторых случаях такая модификация может приводить к увеличению или изменению физиологической активности. В этой связи многие исследования были направлены на химическую модификацию, с помощью которой можно было бы достичь нужной физиологической активности, а большинство таких исследований было направлено на ковалентное связывание физиологически активного вещества (лекарственного средства) с физиологически приемлемым носителем.

Так, например, в публикации Международной патентной заявки № WO 01/93911 описан полимер, имеющий множество кислотных групп в качестве носителя лекарственного средства. В публикации Международной патентной заявки № WO 03/00778 описаны содержащие анионогенную группу амфифильные блоксополимеры, которые, при их использовании в качестве носителя для катионогенного лекарственного средства, повышают стабильность такого лекарственного средства. В Европейском патенте № 0681481 описан метод улучшения свойств основных лекарственных средств с использованием циклодекстрина и кислот в качестве носителей. С другой стороны, гидрофобные лекарственные средства обладают низкой стабильностью *in vivo*, что обусловлено, главным образом, их низкой степенью растворимости в воде. В публикации Международной патентной заявки № WO 04/064731 сообщалось, что для улучшения растворимости гидрофобных лекарственных средств в воде в качестве носителя использовали липид. Однако до настоящего времени не появлялось каких-либо сообщений об использовании Fc-фрагмента иммуноглобулина в качестве носителя лекарственного средства.

Обычно, поскольку полипептиды имеют тенденцию к относительно быстрому разложению, что обусловлено их низкой стабильностью, расщеплением протеолитическими ферментами в крови и свободным прохождением через почки или печень, то белковые лекарственные препараты, содержащие такие полипептиды в качестве фармацевтически эффективных компонентов, должны часто вводиться пациентам для поддержания нужного уровня их концентраций и титров в крови. Однако частое введение белковых лекарственных препаратов, особенно путем инъекции, вызывает боли у пациентов. Для решения этой проблемы было предпринято множество попыток повысить стабильность белковых лекарственных средств в сыворотке и добиться поддержания высоких уровней лекарственных средств в крови в течение длительного периода времени и таким образом максимизировать

фармацевтическую эффективность указанных лекарственных средств. Поэтому возникла необходимость в получении фармацевтических композиций с пролонгированной активностью, которые обеспечивали бы высокую стабильность белковых лекарственных средств и поддержание их титров на достаточно высоких уровнях, не вызывая при этом нежелательных иммунных ответов у пациентов.

Для стабилизации белков и предотвращения их преждевременного ферментативного расщепления и выведения почками обычно, в целях химической модификации поверхности белкового лекарственного средства, используют полимер, обладающий высокой растворимостью, такой как полиэтиленгликоль (далее называемый просто "ПЭГ"). ПЭГ, благодаря своему связыванию со специфическими или различными областями белка-мишени, стабилизирует белок и предотвращает его гидролиз, не вызывая при этом каких-либо серьезных побочных эффектов (Sada et al., J. Fermentation Bioengineering 71:137-139, 1991). Однако это присоединение ПЭГ, несмотря на его способность повышать стабильность белка, связано с такими проблемами, как значительное снижение титров физиологически "активных" белков. Кроме того, с увеличением молекулярной массы ПЭГ уменьшается выход белка, что обусловлено снижением реакционной способности белков.

Недавно были предложены конъюгаты "полимер-белковое лекарственное средство". Так, например, как описано в патенте США № 5738846, для повышения активности белкового лекарственного средства конъюгат может быть получен путем присоединения идентичных белковых лекарственных средств к обоим концам ПЭГ. Кроме того, как описано в публикации Международной патентной заявки WO 92/16221, к обоим концам ПЭГ могут быть присоединены два различных белковых лекарственных средства с получением конъюгата, обладающего двумя различными активностями. Однако вышеуказанные методы оказались не очень эффективными для сохранения уровня активности белковых лекарственных средств.

С другой стороны, в работе Kinstler и др. сообщалось, что гибридный белок, полученный путем связывания гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ) с человеческим альбумином, обладал более высокой стабильностью (Kinstler et al., Pharmaceutical Research 12(12):1883-1888, 1995). Однако в этой публикации указывалось, что поскольку модифицированное лекарственное средство, имеющее структуру "ГКСФ-ПЭГ-альбумин", обнаруживало примерно только четырехкратное увеличение времени его пребывания в организме и лишь небольшое увеличение времени полужизни в сыворотке, по сравнению с нативным ГКСФ, то промышленное производство такого лекарственного средства в качестве эффективного белкового препарата пролонгированного действия не является целесообразным.

Альтернативный метод повышения *in vivo* стабильности физиологически активных белков предусматривает присоединение гена физиологически активного белка к гену, кодирующему белок, обладающий высокой стабильностью в сыворотке, посредством генетической рекомбинации, и культивирование клеток, трансфицированных таким рекомбинантным геном, с получением гибридного (слитого) белка. Так, например, гибридный белок может быть получен путем конъюгирования альбумина, белка, который, как известно, является наиболее эффективным для повышения стабильности белка, или его фрагмента с представляющим интерес физиологически активным белком посредством генетической рекомбинации (публикация Международной патентной заявки № WO 93/15199 и WO 93/15200, публикация Европейской патентной заявки № 413622). Время полужизни гибридного белка интерферона-альфа и альбумина, полученного

компанией Human Genome Science Company и поставляемого под торговым знаком *Albuferon*<sup>TM</sup>, было увеличено с 5 часов до 93 часов у обезьян, однако проблема заключалась в том, что такое увеличение времени полужизни приводило к снижению активности *in vivo* до менее чем 5% по сравнению с немодифицированным интерфероном-альфа (Osborn et al., J. Phar. Exp. Ther. 303(2):540-548, 2002).

Для присоединения белкового лекарственного средства к Fc-фрагменту иммуноглобулина была использована техника рекомбинантных ДНК. Так, например, интерферон (публикация выложенной корейской патентной заявки № 2003-9464) и рецептор интерлейкина-4, рецептор интерлейкина-7 или рецептор эритропоэтина (ЕРО) (Корейский патент, регистрационный номер № 249572) были предварительно экспрессированы у млекопитающих в форме гибрида с Fc-фрагментом иммуноглобулина. В публикации Международной патентной заявки № WO 01/03737 описан гибридный белок, содержащий цитокин или фактор роста, связанные с Fc-фрагментом иммуноглобулина посредством пептидной связи. Кроме того, в патенте США № 5116964 описаны белки, присоединенные к amino-концу или к карбокси-концу Fc-фрагмента иммуноглобулина посредством генетической рекомбинации. В патенте США № 5349053 описан гибридный белок, содержащий IL-2, присоединенный к Fc-фрагменту иммуноглобулина посредством пептидной связи. Другими примерами Fc-гибридных белков, полученных посредством генетической рекомбинации, являются гибридный белок интерферона-бета или его производного и Fc-фрагмента иммуноглобулина (публикация Международной патентной заявки № WO 00/23472) и гибридный белок рецептора IL-5 и Fc-фрагмента иммуноглобулина (патент США № 5712121), гибридный белок интерферона-альфа и Fc-фрагмента иммуноглобулина G4 (патент США № 5723125) и гибрид белка CD4 и Fc-фрагмента иммуноглобулина G2 (патент США № 6451313).

Известны также методы, предусматривающие модификацию аминокислотных остатков Fc-фрагмента иммуноглобулина. Так, например, в патенте США № 5605690 описан гибридный белок TNFR-Fc IgG1, который был получен путем генетической рекомбинации с использованием Fc-фрагмента IgG1, имеющего аминокислотные альтерации в комплемент-связывающей области или в области связывания с рецептором. Кроме того, другие методы получения гибридного белка с использованием Fc-фрагмента иммуноглобулина, модифицированного посредством генетической рекомбинации, описаны в патентах США №№ 6277375, 6410008 и 6444792.

Кроме того, описанные Fc-гибридные белки, продуцированные посредством генетической рекомбинации, имеют следующие недостатки: такой гибридный белок присутствует только в специфической области Fc-фрагмента иммуноглобулина, которая расположена у amino- или у карбокси-конца; продуцируются лишь гомодимерные, а не мономерные формы этого белка; и такой гибрид может находиться только между гликозилированными белками или между агликозилированными белками, и невозможно получить такой гибридный белок, который состоял бы из гликозилированного белка и агликозилированного белка. Кроме того, новая аминокислотная последовательность, созданная путем слияния, может индуцировать иммунные ответы, а линкерная область может оказаться восприимчивой к протеолитическому расщеплению.

Для решения этих проблем авторами настоящей заявки было проведено исследование, в результате которого было установлено, что при введении лекарственного средства в форме гибрида с Fc-фрагментом IgG такое лекарственное

средство имеет повышенную стабильность *in vivo* при минимальном снижении *in vivo* активности.

#### Раскрытие изобретения

Учитывая вышеизложенное, задачей настоящего изобретения является получение фармацевтической композиции, содержащей Fc-фрагмент иммуноглобулина в качестве носителя.

Другой задачей настоящего изобретения является разработка способа увеличения продолжительности действия *in vivo* лекарственного средства путем включения в него Fc-фрагмента иммуноглобулина в качестве носителя.

#### Краткое описание чертежей

Вышеуказанные и другие задачи, а также отличительные признаки и другие преимущества настоящего изобретения будут более понятны из нижеследующего подробного описания, сопровождаемого графическим материалом, где:

на фиг.1 представлены результаты хроматографии Fc-фрагмента иммуноглобулина, полученного путем расщепления иммуноглобулина папаином;

на фиг.2 представлены результаты электрофореза в ДСН-ПААГ очищенного Fc-фрагмента иммуноглобулина (М: маркер молекулярной массы, дорожка 1: IgG; дорожка 2: Fc);

на фиг.3 представлены результаты электрофореза в ДСН-ПААГ для конъюгатов: (А) IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc, (В) <sup>17</sup>Ser-КГСФ-ПЭГ-Fc и (С) ЕРО-ПЭГ-Fc, которые были продуцированы путем реакции связывания (М: маркер молекулярной массы, дорожка 1: Fc, дорожка 2: физиологически активный белок, дорожка 3: конъюгат физиологически активный белок-ПЭГ-Fc);

на фиг.4 представлены результаты эксклюзионной хроматографии конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc, очищенного после реакции связывания;

на фиг.5 представлены результаты масс-спектрометрии MALDI-TOF конъюгата ЕРО-ПЭГ-Fc;

на фиг.6а и 6б представлены результаты масс-спектрометрии MALDI-TOF и ДСН-ПААГ-анализа соответственно нативного Fc-фрагмента иммуноглобулина и дегликозилированного Fc-фрагмента иммуноглобулина (DG Fc);

на фиг. 7 представлены результаты масс-спектрометрии MALDI-TOF конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc и конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG-Fc;

на фиг. 8а-8с представлены результаты обращенно-фазовой ВЭЖХ конъюгатов IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc, IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG-Fc и IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное Fc-фрагмента рекомбинантного AG;

на фиг.9 представлен график, иллюстрирующий результаты фармакокинетического анализа нативного IFN $\alpha$ , комплекса IFN $\alpha$ -40К ПЭГ, конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумина и конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc;

на фиг.10 представлен график, иллюстрирующий результаты фармакокинетического анализа нативного ЕРО, в высокой степени гликозилированного ЕРО, конъюгата ЕРО-ПЭГ-Fc и конъюгата ЕРО-ПЭГ-AG-Fc;

на фиг.11 представлен график, иллюстрирующий результаты фармакокинетического анализа конъюгатов IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc, IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG-Fc и IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное рекомбинантного AG-Fc;

на фиг.12 представлен график, иллюстрирующий результаты фармакокинетического анализа Fab', комплекса Fab'-S-40К-ПЭГ, конъюгата Fab'-N-ПЭГ-N-Fc и конъюгата Fab'-S-ПЭГ-N-Fc;

на фиг.13 представлен график, иллюстрирующий *in vivo*-активности Fab',

комплекса Fab'-S-40K-ПЭГ, конъюгата Fab'-N-ПЭГ-N-Fc и конъюгата Fab'-S-ПЭГ-N-Fc; на фиг.14 представлен график, иллюстрирующий результаты сравнения аффинности связывания человеческих иммуноглобулинов подкласса IgG с комплементом C1q;

на фиг.15 представлен график, иллюстрирующий результаты сравнения аффинности связывания гликозилированного Fc, ферментативно дегликозилированного (DG) Fc и конъюгата интерферон-ПЭГ-носитель, где носителем является негликозилированный (AG) Fc, продуцируемый E.coli, с комплементом C1q.

#### Осуществление изобретения

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей Fc-фрагмент иммуноглобулина в качестве носителя.

Используемый здесь термин "носитель" означает вещество, связанное с лекарственным средством, которое обычно повышает, снижает или нейтрализует физиологическую активность лекарственного средства путем его связывания с указанным лекарственным средством. Однако в целях осуществления настоящего изобретения носитель используется для минимизации снижения физиологической активности представляющего интерес лекарственного средства, связанного с указанным носителем, и для увеличения *in vivo* стабильности этого лекарственного средства.

Настоящее изобретение отличается тем, что для достижения его задач в настоящем изобретении в качестве носителя используется Fc-фрагмент иммуноглобулина.

Fc-фрагмент иммуноглобулина является безопасным для использования в качестве носителя лекарственного средства, поскольку он представляет собой биологически разлагаемый полипептид, который подвергается метаболизму в организме. Кроме того, Fc-фрагмент иммуноглобулина имеет относительно низкую молекулярную массу по сравнению с целыми молекулами иммуноглобулина, что делает его предпочтительным с точки зрения получения, очистки и выхода конъюгата. Кроме того, поскольку Fc-фрагмент иммуноглобулина не содержит Fab-фрагмента, аминокислотная последовательность которого отличается от аминокислотных последовательностей антител других подклассов и который поэтому является в высокой степени негомогенным, то этот Fc-фрагмент может значительно повышать степень гомогенности веществ и является менее антигенным.

Используемый здесь термин "Fc-фрагмент иммуноглобулина" означает белок, который содержит константную область 2 тяжелой цепи ( $C_{H2}$ ) и константную область 3 тяжелой цепи ( $C_{H3}$ ) иммуноглобулина и не содержит переменных областей тяжелой и легкой цепей, константной области 1 тяжелой цепи ( $C_{H1}$ ) и константной области 1 легкой цепи ( $C_{L1}$ ) иммуноглобулина. Кроме того, он может содержать шарнирную область в константной области тяжелой цепи. Fc-фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению может также содержать часть константной области 1 тяжелой цепи ( $C_{H1}$ ) или всю эту область и/или часть константной области 1 легкой цепи ( $C_{L1}$ ) или всю эту область, за исключением переменных областей тяжелой и легкой цепей. Кроме того, в том случае, если Fc-фрагмент иммуноглобулина обладает физиологической функцией, в основном, аналогичной физиологической функции нативного белка, или лучшей физиологической функцией, чем нативный белок, то таким Fc-фрагментом IgG может быть фрагмент, имеющий делецию в относительно длинной части аминокислотной последовательности  $C_{H2}$  и/или  $C_{H3}$ . То есть Fc-фрагмент иммуноглобулина по

настоящему изобретению может содержать (1) домен  $C_{H1}$ , домен  $C_{H2}$ , домен  $C_{H3}$  и домен  $C_{H4}$ , (2) домен  $C_{H1}$  и домен  $C_{H2}$ , (3) домен  $C_{H1}$  и домен  $C_{H3}$ , (4) домен  $C_{H2}$  и домен  $C_{H3}$ , (5) комбинацию одного или нескольких доменов и шарнирной области

иммуноглобулина (или части такой шарнирной области) и (6) димер каждого из этих доменов константных областей тяжелой цепи и константной области легкой цепи.

Fc-фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению включает нативную аминокислотную последовательность и производные этой последовательности (мутанты). Производной аминокислотной последовательностью является последовательность, отличающаяся от нативной аминокислотной последовательности тем, что она включает делецию, инсерцию, не-консервативную или консервативную замену одного или нескольких аминокислотных остатков или их комбинации. Так, например, в Fc IgG аминокислотные остатки в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331, которые, как известно, играют важную роль в связывании, могут быть использованы в качестве подходящей мишени для модификации. Кроме того, могут быть использованы и другие различные производные, включая производные, в которых либо делетирована область, способная образовывать дисульфидную связь, либо элиминированы некоторые аминокислотные остатки, которые обычно присутствуют у N-конца нативной Fc-формы, либо добавлен метиониновый остаток. Кроме того, для ингибирования эффекторных функций может быть осуществлена делеция в комплемент-связывающем сайте, таком как C1q-связывающий сайт и ADCC-сайт. Методы получения таких производных последовательностей Fc-фрагмента иммуноглобулина описаны в публикациях Международных патентных заявок №№ WO 97/34631 и WO 96/32478.

Аминокислотные замены в белках и пептидах, которые, в основном, не влияют на активность таких белков или пептидов, известны специалистам (H. Neurath, R.L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). Наиболее часто встречающимися заменами являются Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly и наоборот.

Кроме того, Fc-фрагмент, если это необходимо, может быть модифицирован путем фосфорилирования, сульфирования, акрилирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования, амидирования и т.п.

Вышеупомянутыми производными Fc являются производные, которые обладают биологической активностью, идентичной активности Fc-фрагмента настоящего изобретения, или обладают повышенной структурной устойчивостью, например, к нагреванию, к изменению pH или т.п.

Кроме того, эти Fc-фрагменты могут быть получены из нативных форм, выделенных у человека и других животных, включая коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомячков, крыс и морских свинок, либо они могут быть их рекомбинантами или производными, полученными из трансформированных клеток животных или микроорганизмов. В соответствии с настоящим изобретением они могут быть получены из нативного иммуноглобулина путем выделения целых иммуноглобулинов из организма человека или животного и их обработки протеолитическим ферментом. Папаин гидролизует нативный иммуноглобулин на Fab- и Fc-фрагменты, а обработка пепсином приводит к продуцированию  $rF'c$ - и  $F(ab')_2$ -фрагментов. Эти фрагменты могут быть подвергнуты, например, эксклюзионной хроматографии для выделения Fc или  $rF'c$ .

Человеческим Fc-фрагментом предпочтительно является рекомбинантный Fc-фрагмент иммуноглобулина, полученный из микроорганизма.

Кроме того, Fc-фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению может присутствовать в форме, имеющей обычно присущее ей число сахарных цепей, или в форме, имеющей повышенное число сахарных цепей по сравнению с нативной формой или пониженное число сахарных цепей по сравнению с нативной формой, либо он может присутствовать в дегликозилированной форме. Увеличение, уменьшение или удаление сахарных цепей Fc-фрагмента иммуноглобулина может быть достигнуто методами, известными специалистам, такими как химический метод, ферментативный метод и метод генной инженерии с использованием микроорганизма. Удаление сахарных цепей из Fc-фрагмента приводит к резкому снижению аффинности связывания с C1q-частью первого компонента комплемента C1, а также к снижению или к потере антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), не индуцируя при этом нежелательных иммунных ответов *in vivo*. В этой связи следует отметить, что Fc-фрагмент иммуноглобулина в дегликозилированной или негликозилированной форме может оказаться более подходящим для использования в настоящем изобретении в качестве носителя лекарственного средства.

Используемый здесь термин "дегликозилирование" означает ферментативное удаление сахарных групп из Fc-фрагмента, а термин "агликозилирование" означает, что Fc-фрагмент был продуцирован в негликозилированной форме прокариотом, предпочтительно *E.coli*.

С другой стороны, Fc-фрагмент иммуноглобулина может происходить от человека или от других животных, включая коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомячков, крыс и морских свинок, а предпочтительно от человека. Кроме того, Fc-фрагментом иммуноглобулина может быть Fc-фрагмент, происходящий от IgG, IgA, IgD, IgE и IgM или полученный из их комбинаций или гибридов. Предпочтительно, если этот Fc-фрагмент происходит от иммуноглобулинов IgG или IgM, которые среди прочих белков присутствуют в наибольшем количестве в крови человека, а наиболее предпочтительно, если он происходит от IgG, который, как известно, увеличивает время полужизни связывающихся с лигандом белков.

С другой стороны, используемый здесь термин "комбинация" означает, что полипептиды, кодирующие одноцепочечные Fc-области иммуноглобулина того же самого происхождения, присоединены к одноцепочечному полипептиду другого происхождения и образуют димер или мультимер. То есть димер или мультимер могут быть образованы из двух или более фрагментов, выбранных из группы, состоящей из Fc-фрагментов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Используемый здесь термин "гибрид" означает, что последовательности, кодирующие два или более Fc-фрагментов иммуноглобулина различного происхождения, присутствуют в одноцепочечном Fc-фрагменте иммуноглобулина. В настоящем изобретении могут быть использованы различные типы гибридов. То есть гибриды доменов могут состоять из одного-четырех доменов, выбранных из группы, состоящей из CH1, CH2, CH3 и CH4 Fc-фрагментов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и могут включать шарнирную область.

С другой стороны, IgG подразделяется на подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и настоящее изобретение включает их комбинации и гибриды. Предпочтительными являются подклассы IgG2 и IgG4, а наиболее предпочтительным является Fc-фрагмент IgG4, который редко обладает эффекторными функциями, такими

как CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность) (см. фиг.14 и 15).

Таким образом, в качестве носителя лекарственного средства по настоящему изобретению наиболее предпочтительным Fc-фрагментом иммуноглобулина является негликозилированный Fc-фрагмент, происходящий от человеческого IgG4.

Человеческий Fc-фрагмент является более предпочтительным, чем Fc-фрагмент, происходящий от другого источника, который может действовать в организме человека как антиген и вызывать нежелательные иммунные ответы, такие как выработка нового антитела против антигена.

Fc-фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению, полученный, как описано выше, действует как носитель лекарственного средства и образует конъюгат с этим лекарственным средством.

Используемый здесь термин "конъюгат лекарственного средства" или "конъюгат" означает, что одно или несколько лекарственных средств связаны с одним или несколькими Fc-фрагментами иммуноглобулина.

Используемый здесь термин "лекарственное средство" означает вещество, обладающее терапевтической активностью при его введении человеку или животному, и примерами такого лекарственного средства являются, но не ограничиваются ими, полипептиды, соединения, экстракты и нуклеиновые кислоты. При этом предпочтительным является полипептидное лекарственное средство.

Используемые здесь термины "физиологически активный полипептид", "физиологически активный белок", "активный полипептид", "полипептидное лекарственное средство" и "белковое лекарственное средство" являются взаимозаменяемыми и отличаются тем, что, присутствуя в физиологически активной форме, они обладают различными физиологическими функциями *in vivo*.

Полипептидное лекарственное средство имеет тот недостаток, что оно неспособно поддерживать физиологическое действие в течение длительного периода времени, что обусловлено присущим ему свойством легко денатурироваться или разлагаться под действием протеолитических ферментов, присутствующих в организме. Однако, если полипептидное лекарственное средство присоединяют к Fc-фрагменту иммуноглобулина по настоящему изобретению с образованием конъюгата, то такое лекарственное средство обладает повышенной структурной стабильностью и увеличенным временем полужизни до разложения. Кроме того, полипептид, конъюгированный с Fc-фрагментом, гораздо меньше подвержен снижению физиологической активности, чем другие известные полипептидные лекарственные препараты. Поэтому, по сравнению с биологической доступностью *in vivo* стандартных полипептидных лекарственных средств, конъюгат по настоящему изобретению, состоящий из полипептида и Fc-фрагмента иммуноглобулина, отличается тем, что он обладает значительно лучшей биологической доступностью *in vivo*. Это также наглядно проиллюстрировано в описании вариантов осуществления изобретения. То есть при связывании с Fc-фрагментом иммуноглобулина по настоящему изобретению лекарственные средства на основе IFN $\alpha$ , ГКСФ, чГР и других белков обнаруживают примерно 2-6-кратное увеличение биологической доступности *in vivo* по сравнению с их стандартными формами, конъюгированными с одним ПЭГ или с ПЭГ и альбумином (таблицы 8, 9 и 10).

С другой стороны, конъюгат белка и Fc-фрагмента иммуноглобулина по настоящему изобретению отличается тем, что он не является гибридом, полученным стандартным рекомбинантным методом. В рекомбинантном методе гибридную форму Fc-фрагмента иммуноглобулина и активного полипептида, используемого в

качестве лекарственного средства, получают так, чтобы указанный полипептид был присоединен к N-концу или С-концу Fc-фрагмента, в результате чего он экспрессируется и подвергается укладке как один полипептид, продуцируемый из нуклеотидной последовательности, кодирующей его гибридную форму.

Это приводит к резкому снижению активности полученного гибридного белка, поскольку активность белка как физиологически функционального вещества определяется конформацией этого белка. Таким образом, при присоединении полипептидного лекарственного средства к Fc-фрагменту рекомбинантным методом не наблюдается какого-либо влияния на биологическую доступность *in vivo*, даже если этот гибридный белок имеет повышенную структурную стабильность. Кроме того, поскольку такой гибридный белок часто имеет неправильную укладку, а поэтому экспрессируется в виде телец включения, то такой метод присоединения, применяемый для продуцирования белка и его выделения, является экономически невыгодным.

Кроме того, если активная форма полипептида является гликозилированной, то такой полипептид должен экспрессироваться в эукариотических клетках. В этом случае Fc также является гликозилированным, и такое гликозилирование может индуцировать нежелательные иммунные ответы *in vivo*.

Таким образом, лишь применение настоящего изобретения позволяет получить конъюгат гликозилированного активного полипептида и агликозилированного Fc-фрагмента иммуноглобулина и позволяет решить все вышеуказанные проблемы, включая увеличение выхода белка, поскольку два компонента этого комплекса получают отдельно и выделяют с использованием самых эффективных систем.

Неограничивающими примерами белковых лекарственных средств, способных образовывать конъюгаты с Fc-фрагментом иммуноглобулина по настоящему изобретению, являются человеческий гормон роста, рилизинг-фактор гормона роста, пептид, высвобождающий гормон роста, интерфероны и рецепторы интерферона (например, интерферон- $\alpha$ , - $\beta$  и - $\gamma$ , водорастворимый рецептор интерферона 1 и т.п.), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), глюкагон-подобные пептиды (например, GLP-1 и т.п.), рецептор, связанный с G-белком, интерлейкины (например, интерлейкин-1,

-2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30 и т.п.) и рецепторы интерлейкинов (например, рецептор IL-1, рецептор IL-4 и т.п.), ферменты (например, глюкоцереброзидаза, идуронат-2-сульфатаза, альфа-галактозидаза-A, агалсидаза-альфа и -бета, альфа-L-идуронидаза, бутирилхолинэстераза, хитиназа, глутамат-декарбоксилаза, имиглюцераза, липаза, уриказа, ацетилгидролаза фактора активации тромбоцитов, нейтральная эндопептидаза, миелопероксидаза и т.п.), интерлейкин- и цитокин-связывающие белки (например, IL-18bp, TNF-связывающий белок и т.п.), фактор активации макрофагов, пептид макрофага, В-клеточный фактор, Т-клеточный фактор, белок А, ингибитор аллергии, гликопротеины некроза клеток, иммунотоксин, лимфотоксин, фактор некроза опухоли, супрессоры опухолей, метастатический фактор роста, антитрипсин альфа-1, альбумин, альфа-лактальбумин, аполипопротеин-Е, эритропоэтин, высокогликозилированный эритропоэтин, ангиопоэтины, гемоглобин, тромбин, пептид, активирующий рецептор тромбина, тромбомодулин, фактор VII, фактор VIIa, фактор VIII, фактор IX, фактор XIII, фактор активации плазминогена, фибрин-связывающий пептид, урокиназа, стрептокиназа, гирудин, белок С, С-реактивный белок, ингибитор ренина, ингибитор коллагеназы,

супероксиддисмутаза, лептин, тромбоцитарный фактор роста, эпителиальный фактор роста, эпидермальный фактор роста, ангиостатин, ангиотензин, фактор роста костей, белок, стимулирующий рост костей, кальцитонин, инсулин, атриопептин, фактор, индуцирующий образование хряща, элкатонин, фактор активации соединительной  
 5 ткани, ингибитор пути тканевого фактора, фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон, фактор высвобождения лютеинизирующего гормона, факторы роста нервной ткани (например, фактор роста нервной ткани, цилиарный нейротропный фактор, фактор-1 аксогенеза, натрийуретический пептид головного  
 10 мозга, глиальный нейротропный фактор, нетрин, ингибитор нейтрофилов, нейротропный фактор, нейтурин и т.п.), паратиреоидный гормон, релаксин, секретин, соматомедин, инсулиноподобный фактор роста, адренкортикостероидный гормон, глюкагон, холецистокинин, панкреатический полипептид, пептид высвобождения гастрин, рилизинг-фактор кортикотропина, тиреоид-стимулирующий гормон,  
 15 аутоаксин, лактоферрин, миостатин, рецепторы (например, TNFR(P75), TNFR(P55), рецептор IL-1, рецептор VEGF, рецептор фактора активации В-клеток и т.п.), антагонисты рецепторов (например, IL-1-Ra и т.п.), антигены клеточной поверхности (например, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69 и т.п.), антигены вирусных вакцин, моноклональные антитела, поликлональные антитела, фрагменты антител (например, оцFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fd) и вакцинные антигены, происходящие  
 20 от вирусов. Фрагментом антитела могут быть фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd или оцFv, способные связываться со специфическим антигеном, а предпочтительно фрагмент Fab'. Fab-фрагменты содержат переменный домен (V<sub>L</sub>) и константный домен (C<sub>L</sub>) легкой цепи и переменный домен (V<sub>H</sub>) и первый константный домен (C<sub>H1</sub>) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов тем, что они содержат несколько дополнительных аминокислотных остатков, включая один или  
 25 несколько цистеиновых остатков шарнирной области со стороны карбокси-конца C<sub>H1</sub>-домена. Fd-фрагменты содержат только V<sub>H</sub>- и C<sub>H1</sub>-домены, а F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты продуцируются в виде пары Fab'-фрагментов, образуемых либо посредством дисульфидной связи, либо посредством химической реакции. оцFv-фрагменты (одноцепочечные Fv-фрагменты) содержат домены V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub>, которые связаны друг с  
 30 другим посредством пептидного линкера, а поэтому присутствуют в одной полипептидной цепи.

В частности, предпочтительными физиологически активными полипептидами являются полипептиды, требующие частого введения в организм пациента для лечения  
 40 или предупреждения заболеваний, и такими полипептидами являются человеческий гормон роста, интерфероны (интерферон-α, -β и -γ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, эритропоэтин (ЕРО) и фрагменты антител. Кроме того, в объем физиологически активных пептидов по настоящему изобретению входят некоторые производные, при условии, что, по сравнению с нативными формами  
 45 физиологически активных полипептидов, они имеют, в основном, аналогичные или улучшенные функции, структуры, активность или стабильность. Наиболее предпочтительным полипептидным лекарственным средством по настоящему изобретению является интерферон-альфа.

50 Помимо полипептидных лекарственных средств, в объем настоящего изобретения входят также и другие лекарственные средства. Неограничивающими примерами таких лекарственных средств являются антибиотики, выбранные из производных и смесей тетрациклина, миноциклина, доксициклина, офлоксацина, левофлоксацина,

ципрофлоксацина, кларитромицина, эритромицина, цефаклора, цефотаксима, имипенема, пенициллина, гентамицина, стрептомицина, ванкомицина и т.п.; противораковые средства, выбранные из производных и смесей метотрексата, карбоплатина, таксола, цисплатина, 5-фторурацила, доксорубина, этопозиды, паклитаксела, камтотецина, арабинозида цитозина и т.п.; противовоспалительные средства, выбранные из производных и смесей индометацина, ибупрофена, кетопрофена, пироксикама, пробупрофена, диклофенака и т.п.; антивирусные средства, выбранные из производных и смесей ацикловира и робавина, и антибактериальные средства, выбранные из производных и смесей кетоназола, итраконазола, флуконазола, амфотерицина В и гризеофульвина.

С другой стороны, Fc-фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению способен образовывать конъюгат, связанный с лекарственным средством посредством линкера.

Таким линкером являются пептидный и не-пептидный линкеры. При этом предпочтительным является не-пептидный линкер, а более предпочтительным является не-пептидный полимер.

Используемый здесь термин "пептидный линкер" означает аминокислоты, а предпочтительно 1-20 аминокислот, которые линейно связаны друг с другом пептидной связью и могут присутствовать в гликозилированной форме. Для задач настоящего изобретения предпочтительно, чтобы они имели агликозилированную форму. Таким пептидным линкером предпочтительно является пептид, имеющий повторяющееся звено из аминокислот Gly и Ser, которые являются иммунологически не активными для Т-клеток.

Используемый здесь термин "не-пептидный полимер" означает биологически совместимый полимер, включающий два или более повторяющихся звена, связанных друг с другом ковалентной связью, за исключением пептидной связи. Примерами не-пептидного полимера являются полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированные полиолы, поливиниловый спирт, полисахариды, декстран, поливиниловый эфир, биологически разлагаемые полимеры, такие как PLA (поли(молочная кислота)) и PLGA (сополимер молочной и гликолевой кислоты), липидные полимеры, хитины и гиалуроновая кислота. Наиболее предпочтительным является полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Конъюгаты по настоящему изобретению "Fc-фрагмент иммуноглобулина - лекарственное средство" или "Fc-фрагмент иммуноглобулина - линкер-лекарственное средство" получают в различных молярных отношениях. То есть число Fc-фрагментов иммуноглобулина и/или линкера, связанного с одним полипептидным лекарственным средством, не имеет ограничений. Однако предпочтительно, чтобы в конъюгате лекарственного средства по настоящему изобретению лекарственное средство и Fc-фрагмент иммуноглобулина были конъюгированы друг с другом в молярном отношении 1:1-10:1, а предпочтительно 1:1-2:1.

Кроме того, связью между Fc-фрагментом иммуноглобулина по настоящему изобретению, определенным линкером и определенным лекарственным средством могут быть не ковалентные связи, за исключением пептидной связи, образуемой в том случае, когда Fc-фрагмент и полипептидное лекарственное средство экспрессируются в виде гибридного белка посредством генетической рекомбинации, и нековалентные связи всех типов, такие как водородные связи, связи, образуемые при ионных взаимодействиях, под действием ван-дер-ваальсовых сил и при гидрофобных взаимодействиях. Однако, с точки зрения физиологической активности

лекарственного средства, предпочтительными связями являются ковалентные связи.

Кроме того, Fc-фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению, определенный линкер и определенное лекарственное средство могут быть связаны друг с другом в определенном сайте лекарственного средства. С другой стороны, Fc-фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению и полипептидное лекарственное средство могут быть связаны друг с другом у N-конца или у C-конца, а предпочтительно посредством свободной группы, а ковалентная связь между Fc-фрагментом иммуноглобулина и лекарственным средством легко образуется, в частности, у amino-конца Fc и у аминокруппы лизинового остатка, аминокруппы гистидинового остатка или свободного цистеинового остатка.

С другой стороны, присоединение Fc-фрагмента иммуноглобулина по настоящему изобретению, определенного линкера и определенного лекарственного средства может быть осуществлено в определенном направлении. То есть такой линкер может быть связан с N-концом, с C-концом или со свободной группой Fc-фрагмента иммуноглобулина, и он может быть также связан с N-концом, с C-концом или со свободной группой белкового лекарственного средства. Если указанным линкером является пептидный линкер, то такая связь может находиться в определенном сайте связывания.

Кроме того, конъюгат по настоящему изобретению может быть получен с использованием любого числа связывающих агентов, известных специалистам. Неограничивающими примерами связывающих агентов являются 1,1-бис-(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, N-гидроксисукцинимидоэфиры, такие как сложные эфиры 4-азидосалициловой кислоты, имидоэфиры, включая дисукцинимидиловые эфиры, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан.

С другой стороны, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, содержащая Fc-фрагмент иммуноглобулина в качестве носителя, может быть введена различными способами.

Используемый здесь термин "введение" означает введение предварительно определенного количества вещества пациенту конкретным подходящим способом. Конъюгат по настоящему изобретению может быть введен любым известным способом при условии, что он обеспечивает его доставку в нужную ткань. Примерами таких способов введения являются, но не ограничиваются ими, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный, пероральный, местный, интраназальный, интрапульмональный и ректальный способы введения. Однако, поскольку при пероральном введении пептиды подвергаются гидролизу, то активные ингредиенты, входящие в состав композиции для перорального введения, должны иметь покрытие, или они должны быть защищены от их разложения в желудке. Композиция по настоящему изобретению может быть предпочтительно введена в форме инъекции. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть введена с использованием определенных устройств, способных доставлять активные ингредиенты в клетки-мишени.

Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по настоящему изобретению, может включать фармацевтически приемлемый носитель. Для перорального введения фармацевтически приемлемый носитель может включать связующие вещества, замасливатели, дезинтеграторы, наполнители, солюбилизаторы, диспергирующие агенты, стабилизаторы, суспендирующие агенты, красители и ароматизаторы. Для инъектируемых препаратов фармацевтически приемлемый

носитель может включать забуферивающие агенты, консерванты, анальгетики, солюбилизаторы, изотонические агенты и стабилизаторы. Для препаратов местного применения фармацевтически приемлемый носитель может включать основания, наполнители, замасливатели и консерванты. Фармацевтические композиции по  
 5 настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде различных лекарственных форм с использованием вышеуказанных фармацевтически приемлемых носителей. Так, например, для перорального введения фармацевтическая композиция может быть  
 10 приготовлена в виде таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов или облаток. Для инъектируемых препаратов фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде разовой лекарственной формы, такой как флакон, содержащий лекарственные средства для многократного приема, или ампула для введения одной дозы. Фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде растворов, суспензий, таблеток, капсул и препаратов пролонгированного действия.

15 С другой стороны, примерами носителей, наполнителей и разбавителей, подходящих для приготовления фармацевтических препаратов, являются лактоза, декстроза, сахароза, сорбит, маннит, ксилит, эритритол, мальтит, крахмал, аравийская камедь, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлоза, метилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, поливинилпирролидон, вода, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральные  
 20 масла. Кроме того, фармацевтические препараты могут включать наполнители, антикоагулянты, замасливатели, увлажнители, отдушки, эмульгаторы и антисептики.

В основном, доза лекарственного средства в комбинации с Fc-фрагментом по  
 25 настоящему изобретению, используемым в качестве носителя, может быть определена в зависимости от нескольких факторов, включая тип заболевания, подвергаемого лечению, способ введения, возраст, пол и вес пациента, тяжесть заболевания пациента, а также тип лекарственного средства, используемого в качестве активного  
 30 компонента. Поскольку фармацевтическая композиция по настоящему изобретению имеет очень длительное время действия *in vivo*, то его преимущество заключается в том, что оно не требует частого введения фармацевтических лекарственных средств.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу увеличения продолжительности действия лекарственного средства *in vivo* путем включения в это  
 35 лекарственное средство Fc-фрагмента иммуноглобулина.

В одном из вариантов осуществления изобретения конъюгат "физиологически активный полипептид-ПЭГ-Fc-фрагмент иммуноглобулина" обладает гораздо  
 40 большей стабильностью, чем комплекс "полипептид-ПЭГ" или конъюгат "полипептид-ПЭГ-альбумин". Фармакокинетический анализ выявил, что при связывании с 40 кДа-ПЭГ (комплекс IFN $\alpha$ -40 К-ПЭГ) время полужизни IFN $\alpha$  в сыворотке примерно в 20 раз выше, чем у нативного IFN $\alpha$ , а в конъюгате IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумин это время полужизни примерно в 10 раз выше, чем у нативного IFN $\alpha$ . В отличие от этого, конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc по настоящему  
 45 изобретению дает увеличение времени полужизни примерно в 50 раз (см. таблицу 3). Кроме того, тот же самый результат наблюдался и с использованием других нужных белков, таких как человеческий гормон роста (чГР), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ) и его производное (<sup>17</sup>S-ГКСФ) и  
 50 эритропозтин (ЕРО). Белковые конъюгаты настоящего изобретения, каждый из которых включает нужный белок, связанный с ПЭГ-Fc, дает примерно 10-кратное увеличение среднего времени пребывания в сыворотке (MRT) и времени полужизни в сыворотке по сравнению с нативными формами белков или формами,

конъюгированными с ПЭГ или с ПЭГ-альбумином (см. таблицы 4-7).

Кроме того, при связывании комплекса ПЭГ-Fc с группой SH возле С-конца Fab' или N-конца Fab' полученный конъюгат Fab'-ПЭГ-Fc обнаруживал в 2 или 3 раза большее время полужизни в сыворотке, чем комплекс 40K-ПЭГ-Fab' (см. фиг.12).

Кроме того, если белковые конъюгаты были получены с использованием дегликозилированного Fc иммуноглобулина (DG Fc), из которого были удалены сахарные группы, и производных рекомбинантного агликозилированного Fc иммуноглобулина (AG Fc), то их время полужизни в плазме и in vitro активность были такими же, как и у белковых конъюгатов, полученных с использованием нативного Fc (см. таблицу 3 и фиг.8 и 11).

Поэтому, поскольку белковые конъюгаты по настоящему изобретению, полученные путем конъюгирования различных физиологически активных полипептидов, включая человеческий гормон роста, интерферон, эритропоэтин, колониестимулирующий фактор или его производные и производные антител, имеют более длительное время полужизни в сыворотке и среднее время пребывания в сыворотке (MRT), то они могут быть использованы для изготовления композиций различных физиологически активных полипептидов пролонгированного действия.

Для лучшего понимания настоящего изобретения ниже описаны примеры, которые приводятся лишь в иллюстративных целях, и не рассматриваются как ограничение объема настоящего изобретения.

Пример 1: Получение I конъюгата "IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc-фрагмент иммуноглобулина"

<Стадия 1> Получение Fc-фрагмента иммуноглобулина с использованием иммуноглобулина

Fc-фрагмент иммуноглобулина получали следующим образом. 200 мг 150 кДа-иммуноглобулина G (IgG) (Green Cross, Korea), растворенного в 10 mM фосфатного буфера, обрабатывали 2 мг протеолитического фермента папаина (Sigma) при 37°C в течение 2 часов при мягком помешивании. После ферментативной реакции регенерированный таким образом Fc-фрагмент иммуноглобулина подвергали хроматографии для последовательной очистки на колонке с Superdex, на колонке с белком А и на катионообменной колонке. Более конкретно, реакционный раствор загружали на колонку с Superdex 200 (Pharmacia), уравновешенную 10 mM натрийфосфатным буфером (PBS, pH 7,3), и колонку элюировали тем же самым буфером при скорости потока 1 мл/мин. Непрореагировавшие молекулы иммуноглобулина (IgG) и F(ab')<sub>2</sub>, которые имели относительно высокую молекулярную массу, сравнимую с молекулярной массой Fc-фрагмента иммуноглобулина, удаляли благодаря их способности элюироваться раньше, чем Fc-фрагмент Ig. Fab-фрагменты, имеющие молекулярную массу, аналогичную молекулярной массе Fc-фрагмента Ig, удаляли колоночной хроматографией на белке А (фиг.1). Полученные фракции, содержащие Fc-фрагмент Ig, элюированный из колонки с Superdex 200, загружали при скорости потока 5 мл/мин на колонку с белком А (Pharmacia), уравновешенную 20 mM фосфатным буфером (pH 7,0), и эту колонку промывали тем же самым буфером для удаления белков, не связанных с колонкой. Затем колонку с белком А элюировали 100 mM натрийцитратного буфера (pH 3,0) и получали Fc-фрагмент иммуноглобулина с высокой степенью чистоты. И наконец, Fc-фракции, собранные из колонки с белком А, очищали на катионообменной колонке (polyCAT, PolyLC, Company), где указанную колонку, загруженную Fc-фракциями, элюировали линейным градиентом 0,15-0,4M NaCl в 10 mM ацетатного буфера (pH 4,5), в результате чего получали Fc-фракции с высокой степенью чистоты.

Fc-фракции с высокой степенью чистоты анализировали с помощью электрофореза в 12% ПААГ с ДСН (дорожка 2 на фиг.2).

#### <Стадия 2> Получение комплекса IFN $\alpha$ -ПЭГ

3,4 кДа-полиэтиленгликоль, имеющий альдегидную реакционноспособную группу по обоим концам, ALD-ПЭГ-ALD (Shearwater), смешивали с человеческим интерфероном альфа-2b (hIFN $\alpha$ -2b, молекулярная масса (MW): 20 кДа), растворенным в 100 мМ фосфатного буфера в количестве 5 мг/мл в молярном отношении IFN $\alpha$ :ПЭГ, равном 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 и 1:20. К этой смеси добавляли восстановитель, а именно цианоборогидрид натрия (NaCNBH<sub>3</sub>, Sigma), в конечной концентрации 20 мМ и проводили реакцию при 4°C в течение 3 часов при мягком помешивании, в результате чего происходило присоединение ПЭГ к amino-концу интерферона-альфа. Для получения комплекса ПЭГ и интерферона-альфа (1:1) реакционную смесь подвергали эксклюзионной хроматографии на колонке с Superdex<sup>®</sup> (Pharmacia). Комплекс IFN $\alpha$ -ПЭГ элюировали с колонки с использованием 10 мМ калийфосфатного буфера (pH 6,0) в качестве элюирующего буфера, и интерферон-альфа, не связанный с ПЭГ, непрореагировавший ПЭГ и димерные побочные продукты, в которых ПЭГ был связан с двумя молекулами интерферона-альфа, удаляли. Очищенный комплекс IFN $\alpha$ -ПЭГ концентрировали до 5 мг/мл. Во время проведения этого эксперимента было обнаружено, что оптимальное молярное отношение IFN $\alpha$  к ПЭГ в данной реакции, при котором обеспечивается самая высокая реактивность и продуцируется наименьшее количество побочных продуктов, таких как димеры, составляло 1:2,5-1:5.

#### <Стадия 3> Получение конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc

Для присоединения комплекса IFN $\alpha$ -ПЭГ, очищенного в стадии 2, к N-концу Fc-фрагмента иммуноглобулина Fc-фрагмент иммуноглобулина (примерно 53 кДа), полученный в стадии 1, растворяли в 10 мМ фосфатного буфера и смешивали с комплексом IFN $\alpha$ -ПЭГ в молярном отношении "комплекс IFN $\alpha$ -ПЭГ:Fc-фрагмент", равном 1:1, 1:2, 1:4 и 1:8. После доведения концентрации фосфатного буфера в реакционном растворе до 100 мМ к реакционному раствору добавляли восстановитель, NaCNBH<sub>3</sub>, в конечной концентрации 20 мМ и смесь оставляли на 20 часов для реакции при 4°C и при мягком помешивании. Во время проведения этого эксперимента было обнаружено, что в данной реакции оптимальное молярное отношение "комплекс IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc-фрагмент", при котором обеспечивается самая высокая реактивность и продуцируется наименьшее количество побочных продуктов, таких как димеры, составляло 1:2.

#### <Стадия 4> Выделение и очистка конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc

После проведения реакции в стадии 3 реакционную смесь подвергали эксклюзионной хроматографии на Superdex для удаления непрореагировавших веществ и побочных продуктов и для очистки продуцируемого белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc. После концентрирования реакционной смеси и ее загрузки на колонку с Superdex, через эту колонку пропускали 10 мМ фосфатный буфер (pH 7,3) при скорости потока 2,5 мл/мин для удаления несвязанного Fc и непрореагировавших веществ, а затем колонку элюировали и собирали фракции белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc. Поскольку собранные фракции белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc содержали небольшое количество примесей, непрореагировавших Fc и димеров интерферона-альфа, то такие примеси удаляли с помощью катионообменной хроматографии. Фракции белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc загружали на колонку PolyCAT LP (PolyLC), уравновешенную 10 мМ ацетата натрия (pH 4,5), и эту колонку элюировали линейным градиентом 0-0,5М NaCl в 10 мМ натрийацетатного

буфера (pH 4,5) с использованием 1М NaCl. И наконец, белковый конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc очищали на анионообменной колонке. Фракции белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc загружали на колонку PolyWAX LP (PolyLC), уравновешенную 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5), а затем колонку элюировали линейным градиентом 0-0,3М NaCl в 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5) с использованием 1М NaCl, в результате чего выделяли белковый конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc с высокой степенью чистоты.

#### Пример 2: Получение II белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc

##### <Стадия 1> Получение комплекса Fc-ПЭГ

3,4 кДа-полиэтиленгликоль, имеющий альдегидную реакционноспособную группу на обоих концах, ALD-ПЭГ-ALD (Shearwater), смешивали с Fc-фрагментом иммуноглобулина, полученным в стадии 1 Примера 1, в молярных отношениях Fc:ПЭГ, равных 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 и 1:20, где Fc-фрагмент Ig растворен в 100 мМ фосфатного буфера в количестве 15 мг/мл. К этой смеси добавляли восстановитель, NaCNBH<sub>3</sub> (Sigma), в конечной концентрации 20 мМ и проводили реакцию при 4°C в течение 3 часов при мягком помешивании. Для получения комплекса ПЭГ и Fc (1:1) реакционную смесь подвергали эксклюзионной хроматографии на колонке с Superdex<sup>®</sup> (Pharmacia). Комплекс Fc-ПЭГ элюировали с колонки с использованием 10 мМ калийфосфатного буфера (pH 6,0) в качестве элюирующего буфера и Fc-фрагмент иммуноглобулина, не связанный с ПЭГ, а также непрореагировавший ПЭГ и димерные побочные продукты, в которых ПЭГ был связан с двумя молекулами интерферона-альфа, удаляли. Очищенный комплекс Fc-ПЭГ концентрировали примерно до 15 мг/мл. Во время проведения этого эксперимента было обнаружено, что оптимальное молярное отношение Fc к ПЭГ в данной реакции, при котором обеспечивается самая высокая реактивность и продуцируется наименьшее количество побочных продуктов, таких как димеры, составляло 1:3 - 1:10.

##### <Стадия 2> Получение и очистка конъюгата "комплекс Fc-ПЭГ-интерферон-альфа"

Для присоединения комплекса Fc-ПЭГ, очищенного в стадии 1, к N-концу IFN $\alpha$  этот комплекс Fc-ПЭГ смешивали с IFN $\alpha$  растворенным в 10 мМ фосфатного буфера в молярном отношении "комплекс Fc-ПЭГ:IFN $\alpha$ ", равном 1:1, 1:1,5, 1:3 и 1:6. После доведения концентрации фосфатного буфера в реакционном растворе до 100 мМ к реакционному раствору добавляли восстановитель, NaCNBH<sub>3</sub>, в конечной концентрации 20 мМ, и смесь оставляли на 20 часов при 4°C и при мягком помешивании для прохождения реакции. После завершения реакции непрореагировавшие вещества и побочные продукты удаляли методом очистки, описанным в стадии 4 примера 1, в результате чего выделяли белковый конъюгат Fc-ПЭГ-IFN $\alpha$  с высокой степенью очистки.

#### Пример 3: Получение конъюгата чГР-ПЭГ-Fc

Получали конъюгат чГР-ПЭГ-Fc, который очищали методом, описанным в Примере 1, за исключением того, что в качестве лекарственного средства вместо интерферона-альфа использовали человеческий гормон роста (чГР, мол.масса: 22 кДа), а молярное отношение чГР:ПЭГ составляло 1:5.

#### Пример 4: Получение конъюгата ГКСФ-ПЭГ-Fc

Получали конъюгат ГКСФ-ПЭГ-Fc, который очищали методом, описанным в Примере 1, за исключением того, что в качестве лекарственного средства вместо интерферона-альфа использовали человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ), а молярное отношение ГКСФ:ПЭГ составляло 1:5.

Кроме того, белковый конъюгат  $^{17}\text{S}$ -ГКСФ-ПЭГ-Fc получали и очищали методом, описанным выше, с использованием производного ГКСФ,  $^{17}\text{S}$ -ГКСФ, в котором семнадцатый аминокислотный остаток нативного ГКСФ был заменен серином.

Пример 5: Получение конъюгата ЕРО-ПЭГ-Fc

Конъюгат ЕРО-ПЭГ-Fc получали и очищали методом, описанным в Примере 1, за исключением того, что в качестве лекарственного средства вместо интерферона-альфа использовали человеческий эритропоэтин (ЕРО), а молярное отношение ЕРО:ПЭГ составляло 1:5.

Пример 6: Получение белкового конъюгата с использованием ПЭГ, имеющего другую реакционноспособную группу

Белковый конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc получали с использованием ПЭГ, имеющего сукцинимидилпропионатную (SPA) реакционноспособную группу по обоим концам, в соответствии с нижеследующей процедурой. 3,4 кДа-полиэтиленгликоль, SPA-ПЭГ-SPA (Shearwater), смешивали с 10 мг интерферона-альфа, растворенного в 100 мМ фосфатного буфера в молярных отношениях IFN $\alpha$ :ПЭГ, равных 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 и 1:20. Затем смесь подвергали реакции при комнатной температуре при мягком помешивании в течение 2 ч. Для получения комплекса ПЭГ и интерферона-альфа (1:1) (комплекса IFN $\alpha$ -ПЭГ), где ПЭГ был селективно присоединен к аминогруппе лизинового остатка интерферона-альфа, реакционную смесь подвергали эксклюзионной хроматографии на Superdex. Комплекс IFN $\alpha$ -ПЭГ элюировали с колонки с использованием 10 мМ калийфосфатного буфера (pH 6,0) в качестве элюирующего буфера, а затем интерферон-альфа, не связанный с ПЭГ, непрореагировавший ПЭГ и димерные побочные продукты, в которых две молекулы интерферона-альфа были присоединены по обоим концам ПЭГ, удаляли. Для связывания комплекса IFN $\alpha$ -ПЭГ с аминогруппой лизинового остатка Fc-фрагмента иммуноглобулина очищенный комплекс IFN $\alpha$ -ПЭГ концентрировали примерно до 5 мг/мл, после чего получали конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc, который очищали методами, описанными в стадиях 3 и 4 примера 1. В результате проведения этого эксперимента было обнаружено, что оптимальное молярное отношение IFN $\alpha$ :ПЭГ в данной реакции, при котором обеспечивается самая высокая реакционная способность и продуцируется наименьшее количество побочных продуктов, таких как димеры, составляло 1:2,5-1:5.

Кроме того, получали другой конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc методами, описанными выше, с использованием ПЭГ, имеющего N-гидроксисукцинимидильную (NHS) реакционноспособную группу на обоих концах, NHS-ПЭГ-NHS (Shearwater), или ПЭГ, имеющего бутилальдегидную реакционноспособную группу на обоих концах, BUA-ПЭГ-BUA (Shearwater).

Пример 7: Получение белкового конъюгата с использованием ПЭГ, имеющего другую молекулярную массу

Комплекс IFN $\alpha$ -10кДа ПЭГ получали с использованием 10 кДа-полиэтиленгликоля, имеющего альдегидную реакционноспособную группу по обоим концам, ALD-ПЭГ-ALD (Shearwater). Этот комплекс получали и очищали методом, используемым в стадии 2 примера 1. В результате проведения этого эксперимента было обнаружено, что оптимальное молярное отношение IFN $\alpha$ :10 кДа-ПЭГ в данной реакции, при котором обеспечивается самая высокая реактивность и продуцируется наименьшее количество побочных продуктов, таких как димеры, составляло 1:2,5-1:5. Очищенный комплекс IFN $\alpha$ -10 кДа-ПЭГ концентрировали примерно до 5 мг/мл и с использованием этого концентрата получали конъюгат IFN $\alpha$ -10кДа ПЭГ-Fc, который

очищали методами, описанными в стадиях 3 и 4 примера 1.

Пример 8: Получение конъюгата Fab'-S-ПЭГ-N-Fc (с группой -SH)

<Стадия 1> Экспрессия и очистка Fab'

Трансформант E.coli, BL21/poDHLF (регистрационный номер: KCCM-10511),  
экспрессирующий Fab'-фрагмент против фактора некроза опухоли-альфа,  
культивировали, перемешивая, в 100 мл среды LB в течение ночи, а затем  
инокулировали в 5-литровый ферментер (Marubishi) и культивировали при 30°C и  
при 500 об/мин при скорости воздушного потока 20 об.% в минуту. В целях  
компенсации недостатка питательных элементов для роста бактерий в процессе  
ферментации в культуры добавляли глюкозу и дрожжевые экстракты в зависимости от  
состояния сбраживания бактерий. После того как культуры достигали величины  
OD<sub>600</sub>, равной 80-100, в эти культуры добавляли индуктор, IPTG, для индуцирования  
экспрессии белка. Затем культуры выращивали в течение 40-45 часов до тех пор, пока  
значение OD при 600 нм не увеличивалось до 120-140. Полученную таким образом  
сбраживаемую жидкость центрифугировали при 20000g в течение 30 минут. Затем  
супернатант собирали и осадок отбрасывали.

Супернатант подвергали описанной ниже трехстадийной колоночной  
хроматографии для очистки Fab'-фрагмента против фактора некроза опухоли-альфа.  
Этот супернатант загружали на колонку HiTrap с белком G (5 мл, Pharmacia),  
уравновешенную 20 мМ фосфатным буфером (pH 7,0), и колонку элюировали 100 мМ  
глицином (pH 3,0). Затем собранные Fab'-фракции загружали на колонку с Superdex 200  
(Pharmacia), уравновешенную 10 мМ натрийфосфатным буфером (PBS, pH 7,3), и эту  
колонку элюировали тем же самым буфером. И наконец, вторые Fab'-фракции  
загружали на колонку polyCAT 21 × 250 (PolyLC) и эту колонку элюировали линейным  
градиентом NaCl 0,15-0,4М в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4,5) с получением  
фракций Fab'-фрагмента против фактора некроза опухоли-альфа с высокой степенью  
чистоты.

<Стадия 2> Получение и очистка комплекса Fc-ПЭГ

Для присоединения линкера ПЭГ к N-концу Fc-фрагмента иммуноглобулина  
Fc-фрагмент иммуноглобулина, полученный методом, описанным в стадии 1  
примера 1, растворяли в 100 мМ фосфатного буфера (pH 6,0) при концентрации 5  
мг/мл и смешивали с NHS-ПЭГ-MAL (3,4 кДа, Shearwater) в молярном отношении  
Fc:ПЭГ, равном 1:10, а затем инкубировали при 4°C в течение 12 часов при мягком  
помешивании.

После завершения реакции реакционный буфер заменяли 20 мМ натрийфосфатным  
буфером (pH 6,0) для удаления несвязанного NHS-ПЭГ-MAL. Затем реакционную  
смесь загружали на колонку polyCAT (PolyLC). Эту колонку элюировали линейным  
градиентом 0,15-0,5М NaCl в 20 мМ натрийфосфатного буфера (pH 6,0). В процессе  
элюирования комплекс "Fc-фрагмент иммуноглобулина - ПЭГ" элюировался раньше,  
чем непрореагировавший Fc-фрагмент иммуноглобулина, а непрореагировавший Fc Ig  
элюировался позже, что позволяло удалять непрореагировавшие молекулы Fc Ig.

<Стадия 3> Получение и очистка конъюгата Fab'-S-ПЭГ-N-Fc (с группой -SH)

Для связывания комплекса "Fc-фрагмент иммуноглобулина - ПЭГ" с цистеиновой  
группой Fab' этот Fab', очищенный в стадии 1, растворяли в 100 мМ натрийфосфатного  
буфера (pH 7,3) при концентрации 2 мг/мл и смешивали с комплексом "Fc-фрагмент  
иммуноглобулина-ПЭГ, полученным выше в стадии 2, в молярном отношении  
Fab':комплекс, равном 1:5. Реакционную смесь концентрировали до конечной  
концентрации белка 50 мг/мл и инкубировали при 4°C в течение 24 часов при мягком

помешивании.

После завершения реакции реакцию смесь загружали на колонку с Superdex 200 (Pharmacia), уравновешенную 10 мМ натрийфосфатного буфера (pH 7,3), и колонку элюировали тем же самым буфером при скорости потока 1 мл/мин. Связанный конъюгат Fab'-S-ПЭГ-N-Fc элюировался относительно рано, что обусловлено его высокой молекулярной массой, а непрореагировавший комплекс "Fc-фрагмент иммуноглобулина-ПЭГ" и Fab' элюировались позже, что позволяло удалять непрореагировавшие молекулы. Для полного удаления непрореагировавшего комплекса "Fc иммуноглобулина-ПЭГ" собранные фракции конъюгата Fab'-S-ПЭГ-N-Fc снова загружали на колонку polyCAT, 21 × 250 (PolyLC) и эту колонку элюировали линейным градиентом NaCl 0,15-0,5М в 20 мМ натрийфосфатного буфера (pH 6,0), в результате чего получали чистый конъюгат Fab'-S-ПЭГ-N-Fc, содержащий комплекс Fc-ПЭГ, связанный с группой -SH возле C-конца Fab'.

Пример 9: Получение конъюгата Fab'-N-ПЭГ-N-Fc (с N-концом)

<Стадия 1> Получение и очистка комплекса Fab'-ПЭГ (с N-концом)

40 мг Fab', очищенного в стадии 1 примера 8, растворяли в 100 мМ натрийфосфатного буфера (pH 6,0) при концентрации 5 мг/мл, и смешивали с бутил-ALD-ПЭГ-бутил-ALD (3,4 кДа, Nektar) в молярном отношении Fab':ПЭГ, равном 1:5. К реакционной смеси добавляли восстановитель, NaCNBH<sub>3</sub>, при конечной концентрации 20 мМ, а затем смесь подвергали реакции при 4°C в течение 2 часов при мягком помешивании.

После завершения реакции реакционный буфер заменяли 20 мМ натрийфосфатным буфером (pH 6,0). Затем реакцию смесь загружали на колонку polyCAT (PolyLC). Эту колонку элюировали линейным градиентом NaCl 0,15-0,4М в 20 мМ ацетатном буфере (pH 4,5). В процессе элюирования с колонки комплекс Fab'-ПЭГ, содержащий линкер ПЭГ, связанный с N-концом Fab', элюировался раньше, чем непрореагировавший Fab', а непрореагировавший Fab' элюировался позже, что позволяло удалять непрореагировавшие молекулы Fab'.

<Стадия 2> Получение и очистка конъюгата Fab'-N-ПЭГ-N-Fc

Для связывания комплекса Fab'-ПЭГ, очищенного в вышеописанной стадии 1, с N-концом Fc иммуноглобулина комплекс Fab'-ПЭГ растворяли в 100 мМ натрийфосфатного буфера (pH 6,0) при концентрации 10 мг/мл и смешивали с Fc-фрагментом иммуноглобулина, растворенным в том же самом буфере в молярном отношении "комплекс Fab'-ПЭГ:Fc", равном 1:5. После концентрирования реакционной смеси до конечной концентрации белка 50 мг/мл к реакционной смеси добавляли восстановитель, NaCNBH<sub>3</sub>, при конечной концентрации 20 мМ, а затем реакцию смесь подвергали реакции при 4°C в течение 24 часов при мягком помешивании.

После завершения реакции реакцию смесь загружали на колонку с Superdex 200 (Pharmacia), уравновешенную 10 мМ натрийфосфатного буфера (pH 7,3), и колонку элюировали тем же самым буфером при скорости потока 1 мл/мин. Связанный конъюгат Fab'-N-ПЭГ-N-Fc элюировался относительно рано, что обусловлено его высокой молекулярной массой, а непрореагировавший Fc-фрагмент иммуноглобулина и комплекс Fab'-ПЭГ элюировался позже, что позволяло удалять непрореагировавшие молекулы. Для полного удаления непрореагировавших молекул Fc иммуноглобулина собранные фракции конъюгата Fab'-N-ПЭГ-N-Fc снова загружали на колонку polyCAT 21 × 250 (PolyLC) и эту колонку элюировали линейным градиентом NaCl 0,15-0,5М в 20 мМ натрийфосфатном буфере (pH 6,0), в результате

чего получали чистый конъюгат Fab'-N-ПЭГ-N-Fc, содержащий комплекс "Fc иммуноглобулина-ПЭГ", связанный с N-концом Fab'.

Пример 10: Получение и очистка дегликозилированного Fc иммуноглобулина

200 мг Fc иммуноглобулина, полученного методом, описанным в примере 1, растворяли в 100 мМ фосфатного буфера (pH 7,5) при концентрации 2 мг/мл и смешивали с 300 ед./мг дегликозилазы, PNGазы F (NEB). Реакционную смесь оставляли на 24 часа при 37°C для прохождения реакции при мягком помешивании. Затем, для очистки дегликозилированного Fc-фрагмента иммуноглобулина, реакционную смесь загружали на колонку с SP сефарозой FF (Pharmacia) и колонку элюировали линейным градиентом NaCl 0,1-0,6 М в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4,5) с использованием 1М NaCl. Нативный Fc иммуноглобулина элюировался раньше, а дегликозилированный Fc иммуноглобулина (DG Fc) элюировался позже.

Пример 11: Получение конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc

Для связывания дегликозилированного Fc иммуноглобулина, полученного, как описано в примере 10, с комплексом IFN $\alpha$ -ПЭГ, очищенным в стадии 2 примера 1, комплекс IFN $\alpha$ -ПЭГ смешивали с DG Fc, растворенным в 10 мМ фосфатного буфера в молярном отношении комплекс IFN $\alpha$ -ПЭГ:DG Fc, равном 1:1, 1:2, 1:4 и 1:8. После доведения концентрации фосфатного буфера реакционного раствора до 100 мМ к реакционному раствору добавляли восстановитель, NaCNBH<sub>3</sub>, при конечной концентрации 20 мМ, а затем смесь подвергали реакции при 4°C в течение 2 часов при мягком помешивании. При проведении этого эксперимента было обнаружено, что оптимальное молярное отношение комплекса IFN $\alpha$ -ПЭГ к DG Fc в реакционной смеси, при котором обеспечивалась самая высокая реактивность и продуцировалось наименьшее количество побочных продуктов, таких как димеры, составляет 1:2.

После завершения реакции реакционную смесь подвергали эксклюзионной хроматографии на колонке с Superdex (Pharmacia) для удаления непрореагировавших веществ и побочных продуктов и для очистки белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc. После загрузки реакционной смеси на колонку через эту колонку пропускали фосфатный буфер (pH 7,3) при скорости потока 2,5 мл/мин для удаления несвязанного DG Fc и непрореагировавших веществ и колонку элюировали для сбора фракций белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc. Поскольку собранные фракции белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc содержали небольшое количество примесей непрореагировавшего DG Fc и комплекса IFN $\alpha$ -ПЭГ, то эти примеси удаляли с помощью катионообменной хроматографии. Фракции белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc загружали на колонку polyCAT LP (PolyLC), уравновешенную 10 мМ ацетата натрия (pH 4,5), и эту колонку элюировали линейным градиентом 0-0,6М NaCl в 10 мМ натрийацетатного буфера (pH 4,5) с использованием 1М NaCl. И наконец, белковый конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc очищали на анионообменной колонке. Фракции белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc загружали на колонку PolyWAX LP (PolyLC), уравновешенную 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5), а затем колонку элюировали линейным градиентом 0-0,3М NaCl в 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5) с использованием 1М NaCl и выделяли белковый конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc с высокой степенью чистоты.

Пример 12: Получение и очистка рекомбинантного производного агликозилированного Fc иммуноглобулина

<Получение экспрессирующего вектора производного 1 Fc IgG4>

Для создания константных областей тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG4 получали первое производное (дельта-Cys IgG4), имеющее делецию в девять аминокислот на amino-конце нативной шарнирной области, и

второе производное (мономер IgG4), в котором отсутствовала шарнирная область в результате делеции всех двенадцати аминокислот шарнирной области. В качестве экспрессирующего вектора, содержащего секреторную последовательность E.coli, использовали плазмиду pT14S1SH-4T20V22Q (патент Кореи № 38061), полученную

Для получения константных областей тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG4 в соответствии с нижеследующей процедурой проводили ОТ-ПЦР с использованием РНК, выделенной из клеток крови человека, в качестве матрицы. Сначала всю РНК выделяли примерно из 6 мл крови с использованием набора для выделения РНК крови Qiamp (Qiagen) и гены амплифицировали с использованием полноразмерной РНК в качестве матрицы и с использованием набора для одностадийной ОТ-ПЦР (Qiagen). В этой ПЦР использовали пару синтезированных праймеров, представленных в SEQ ID NO:1 и 2, и другую пару синтезированных праймеров, представленных в SEQ ID NO:2 и 3. SEQ ID NO:1 представляет собой нуклеотидную последовательность из 12 аминокислотных остатков шарнирной области IgG4, начиная с 10-го остатка, серина, и ниже. SEQ ID NO:3 имеет нуклеотидную последовательность, кодирующую домен C<sub>H</sub>2, содержащий аланин в качестве первого аминокислотного остатка. SEQ ID NO:2 имеет BamHI-сайт распознавания, содержащий стоп-кодон.

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
| gag | tcc | aaa | tat | ggt | ccc | cca | tgc | cca | tca | tgc | cca |
| ctc | agg | ttt | ata | cca | ggg | ggt | acg | ggt | agt | acg | ggt |
| Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Ser | Cys | Pro |

Для клонирования каждого фрагмента константной области амплифицированного IgG4 в экспрессирующий вектор, содержащий производное секреторной последовательности E.coli, использовали плазмиду pT14S1SH-4T20V22Q (патент Кореи № 38061), полученную авторами настоящего изобретения еще до подачи настоящей заявки. Этот экспрессирующий вектор содержит производное секреторной последовательности термостабильного энтеротоксина, имеющее нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4. Для облегчения клонирования StuI-сайт распознавания встраивали в конец производного секреторной последовательности плазмиды pT14S1SH-4T20V22Q термостабильного энтеротоксина E.coli посредством сайт-направленного мутагенеза с использованием пары праймеров, представленных в SEQ ID NO:5 и 6, в целях индуцирования мутагенеза для введения StuI-сайта в нуклеотидную последовательность, кодирующую последний аминокислотный остаток секреторной последовательности. При секвенировании ДНК было установлено, что встраивание StuI-сайта было успешным. Полученную плазмиду pT14S1SH-4T20V22Q, содержащую StuI-сайт, обозначали "pmSTII". Эту плазмиду pmSTII обрабатывали ферментами StuI и BamHI и подвергали электрофору в агарозном геле, в результате чего получали очищенный большой фрагмент (4,7 т.п.н.), который содержал производное секреторной последовательности термостабильного энтеротоксина E.coli. Затем амплифицированные генные фрагменты гидролизовали ферментом BamHI и лигировали с линеаризованным экспрессирующим вектором, в результате чего получали pSTIIIdCG4Fc и pSTIIG4Mo.

Конечные экспрессирующие векторы отдельно трансформировали в BL21(DE3)

E.coli, и полученные трансформанты были обозначены "BL21/pSTIIIdCG4Fc (HM10932)" и "BL21/pSTIIIG4Mo

(HM10933)" и депонированы в Корейском центре культур микроорганизмов (KCCM) 15 сентября 2004 под регистрационными номерами KCCM-10597 и KCCM-10598 соответственно. атем, когда культуры достигали  $OD_{600}=80$ , в эти культуры добавляли индуктор IPTG для индуцирования экспрессии белка. После этого культуры культивировали в течение 40-45 часов до тех пор, пока значение OD при 600 нм не достигало 100-120. Клетки E.coli, собранные из сбраживаемых жидкостей, разрушали, и полученные клеточные лизаты подвергали двухстадийной колоночной хроматографии для очистки производных константных областей рекомбинантного иммуноглобулина, присутствующих в цитозоле E.coli.

5 мл-аффинную колонку с белком-A (Pharmacia) уравнивали PBS и клеточные лизаты загружали на колонку при скорости потока 5 мл/мин. Несвязанные белки отмывали PBS, а связанные белки элюировали 100 mM цитратом (pH 3,0). Собранные фракции обессоливали на обессоливающей колонке HiPrep 26/10 (Pharmacia) с использованием 10 mM трис-буфера (pH 8,0). Затем осуществляли вторую анионообменную колоночную хроматографию на 50 мл-колонке с Q HP 26/10 (Pharmacia). Первичные очищенные Fc-фракции рекомбинантного агликозилированного иммуноглобулина загружали на колонку с Q-сефарозой HP 26/10 и колонку элюировали линейным градиентом 0-0,2 M NaCl в 10 mM трис-буфере (pH 8,0), в результате чего получали производное Fc рекомбинантного агликозилированного иммуноглобулина (AG Fc) с высокой степенью чистоты, дельта-Cys IgG4 и мономерную фракцию IgG4 с высокой степенью чистоты.

#### Пример 13: Получение конъюгата комплекса IFN $\alpha$ -ПЭГ и производного рекомбинантного AG Fc

В соответствии с методами, описанными в примерах 1 и 11, комплекс IFN $\alpha$ -ПЭГ присоединяли к N-концу дельта-Cys IgG4 в качестве производного AG Fc, полученного, как описано в примере 12. После реакции присоединения непрореагировавшие вещества и побочные продукты удаляли из реакционной смеси и полученный таким образом белковый конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-AG Fc (I) сначала очищали на 50 мл-колонке с Q HP 26/10 (Pharmacia), а затем очищали с помощью аналитической жидкостной хроматографии высокого давления на колонке polyCAT LP 21,5  $\times$  250 (PolyLC), в результате чего получали конъюгат с высокой степенью очистки. Реакционный раствор для связывания обессоливали на обессоливающей колонке HiPrep 26/10 (Pharmacia) с использованием 10 mM трис-буфера (8,0). Затем реакционный раствор загружали на 20 мл-колонку с Q HP 26/10 (Pharmacia) при скорости потока 8 мл/мин и эту колонку элюировали линейным градиентом 0-0,2M NaCl с получением нужных фракций. Собранные фракции снова загружали на колонку polyCAT 21,5  $\times$  250, уравновешенную 10 мл ацетатным буфером (pH 5,2), при скорости потока 15 мл/мин и эту колонку элюировали линейным градиентом 0,1-0,3M NaCl и получали фракции с высокой степенью чистоты. В соответствии с методом, описанным выше, получали другой белковый конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-AG Fc (II) с использованием другого производного AG Fc, полученного, как описано в примере 12, мономера IgG4.

#### Пример 14: Получение конъюгата "ЕРО-ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc"

Методом, описанным в примере 13, получали конъюгат "ЕРО-ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc" путем присоединения производного AG Fc, дельта-Cys IgG4,

к комплексу ЕРО-ПЭГ.

#### Сравнительный пример 1: Получение комплекса IFN $\alpha$ -40К ПЭГ

5 мг интерферона-альфа растворяли в 100 мМ фосфатного буфера до конечного объема 5 мл и смешивали с активированным 40

кДа-метокси-ПЭГ-альдегидом (Shearwater) в молярном отношении IFN $\alpha$ :40 кДа-ПЭГ, равном 1:4. К этой смеси добавляли восстановитель, NaCNBH<sub>3</sub>, при конечной концентрации 20 мМ и смесь оставляли для прохождения реакции на 18 часов при 4°C и при мягком помешивании. Для инактивации ПЭГ, который не реагирует с IFN $\alpha$ , к реакционной смеси добавляли этаноламин при конечной концентрации 50 мМ.

Колонку с сефадексом G-25 (Pharmacia) использовали для удаления непрореагировавшего ПЭГ и этот буфер заменяли другим буфером. Сначала эту колонку уравнивали двумя колоночными объемами (КО) 10 мМ Трис-НСl-буфера (pH 7,5), а затем в нее загружали реакционную смесь. Скорость потока детектировали путем измерения оптической плотности при 260 нм на УФ-спектрофотометре. При элюировании колонки тем же самым буфером интерферон-альфа, модифицированный путем присоединения ПЭГ с более высокой молекулярной массой к его N-концу, элюировался раньше, а непрореагировавший ПЭГ элюировался позже, что позволяло выделять только IFN $\alpha$ -40К ПЭГ.

Описанную ниже хроматографию проводили для дополнительной очистки комплекса IFN $\alpha$ -40К ПЭГ из собранных фракций. 3 мл-колонку PolyWAX LP (PolyLC) уравнивали 10 мМ Трис-НСl (pH 7,5). Собранные фракции, содержащие комплекс IFN $\alpha$ -40К ПЭГ, загружали на колонку при скорости потока 1 мл/мин и эту колонку промывали 15 мл уравнивающего буфера. Затем колонку элюировали линейным градиентом NaCl 0-100% с использованием 30 мл 1М NaCl, в результате чего осуществляли последовательное элюирование интерферона-альфа, конъюгированного с три-, ди- и моно-ПЭГ. Для последующей очистки моно-ПЭГ-конъюгированного интерферона-альфа собранные фракции, содержащие моно-ПЭГ-конъюгированный интерферон-альфа, подвергали эксклюзионной хроматографии. Фракции концентрировали и загружали на колонку с Superdex 200 (Pharmacia), уравнивленную 10 мМ натрийфосфатного буфера (pH 7,0), и эту колонку элюировали тем же самым буфером при скорости потока 1 мл/мин. Молекулы три- и ди-ПЭГ-конъюгированного интерферона-альфа удаляли исходя из их способности элюироваться раньше, чем моно-ПЭГ-конъюгированный интерферон-альфа, в результате чего выделяли моно-ПЭГ-конъюгированный интерферон-альфа с высокой степенью чистоты.

В соответствии с методом, описанным выше, 40 кДа-ПЭГ конъюгировали с N-концом человеческого гормона роста, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ) и производного ГКСФ, в результате чего получали комплексы чГР-40К ПЭГ, ГКСФ-40К ПЭГ и производное 40К ПЭГ-<sup>17</sup>S-ГКСФ.

#### Сравнительный пример 2: Получение конъюгата "IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумин"

Для присоединения комплекса IFN $\alpha$ -ПЭГ, очищенного в стадии 2 примера 1, к N-концу альбумина комплекс IFN $\alpha$ -ПЭГ смешивали с альбумином человеческой сыворотки (HSA, примерно 67 кДа, Green Cross), растворенным в 10 мМ фосфатного буфера в молярном отношении "комплекс IFN $\alpha$ -ПЭГ:альбумин", равном 1:1, 1:2, 1:4 и 1:8. После доведения концентрации фосфатного буфера реакционного раствора до 100 мМ к реакционному раствору добавляли восстановитель, NaCNBH<sub>3</sub>, при конечной концентрации 20 мМ и смесь оставляли на 20 часов для реакции при 4°C и при мягком помешивании. При проведении этого эксперимента было обнаружено, что

оптимальное молярное отношение комплекса IFN $\alpha$ -ПЭГ к альбумину в реакционной смеси, при котором обеспечивается наибольшая реактивность и продуцируется наименьшее количество побочных продуктов, таких как димеры, составляет 1:2.

После завершения реакции присоединения реакционную смесь подвергали эксклюзионной хроматографии на колонке с Superdex<sup>®</sup> (Pharmacia) для удаления непрореагировавших веществ и побочных продуктов и для очистки продуцированного белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумин. После концентрирования реакционной смеси и ее загрузки на колонку через эту колонку пропускали 10 мМ натрийацетатный буфер при скорости потока 2,5 мл/мин для удаления несвязанного альбумина и непрореагировавших веществ, а затем колонку элюировали для очистки только белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумин. Поскольку собранные фракции белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумин содержали небольшое количество примесей, непрореагировавшего альбумина и димеров интерферона-альфа, то эти примеси удаляли с помощью катионообменной хроматографии. Фракции белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумин загружали на колонку SP5PW (Waters), уравновешенную 10 мМ ацетата натрия (pH 4,5), и эту колонку элюировали линейным градиентом 0-0,5М NaCl в 10 мМ натрийацетатного буфера (pH 4,5) с использованием 1М NaCl, в результате чего выделяли белковый конъюгат "IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумин" с высокой степенью очистки.

Методом, описанным выше, альбумин конъюгировали с человеческим гормоном роста, ГКСФ, и с производным ГКСФ, в результате чего получали конъюгаты чГР-ПЭГ-альбумин, ГКСФ-ПЭГ-альбумин и <sup>17</sup>S-ГКСФ-ПЭГ-альбумин.

#### Сравнительный пример 3: Получение комплекса Fab'-S-40К ПЭГ

Свободный цистеиновый осаток Fab'-фрагмента, очищенного в стадии 1 примера 8, активировали путем инкубирования в активирующем буфере (20 мМ ацетат натрия (pH 4,0), 0,2 мМ (DTT) в течение 1 часа. Затем буфер заменяли ПЭГ-модифицирующим буфером, 50 мМ фосфатом калия (pH 6,5), добавляли малеимид-ПЭГ (Mw: 40 кДа, Shearwater) в молярном отношении Fab':40 кДа ПЭГ = 1:10 и проводили реакцию при 4°C в течение 24 часов при мягком помешивании.

После завершения реакции реакционный раствор загружали на колонку с Superdex 200 (Pharmacia), уравновешенную 10 мМ натрийфосфатным буфером (pH 7,3), и эту колонку элюировали тем же самым буфером при скорости потока 1 мл/мин. Fab', конъюгированный с 40 кДа ПЭГ (Fab'-40К ПЭГ), элюировался относительно рано, что обусловлено его высокой молекулярной массой, а непрореагировавший Fab' элюировался позже, что позволяло удалять непрореагировавший Fab'. Для полного удаления непрореагировавшего Fab' собранные фракции комплекса Fab'-40К ПЭГ снова загружали на колонку polyCAT, 21 × 250 (PolyLC) и эту колонку элюировали линейным градиентом 0,15-0,5М NaCl в 20 мМ натрийфосфатного буфера (pH 4,5), в результате чего получали чистый комплекс Fab'-S-40К ПЭГ, содержащий 40-кДа ПЭГ, присоединенный к группе -SH фрагмента Fab'.

#### Экспериментальный пример 1: Идентификация и количественный анализ белковых конъюгатов

##### <1-1> Идентификация белковых конъюгатов

Белковые конъюгаты, полученные, как описано в предыдущих примерах, анализировали с помощью электрофореза в нередуцирующем ПААГ с ДСН с использованием 4-20% градиентного геля и 12% геля и ELISA (R&D System).

Результаты ДСН-ПААГ-анализа, проиллюстрированные на фиг.3, показали, что реакция связывания физиологически активного полипептида, не-пептидного

полимера, ПЭГ и Fc-фрагмента иммуноглобулина приводила к успешному продуцированию конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc (A), конъюгата <sup>17</sup>Ser-КГСФ-ПЭГ-Fc (B) и конъюгата ЕРО-ПЭГ-Fc (C).

Кроме того, DG Fc, полученный, как описано в примере 10, анализировали с помощью электрофореза в нередуцирующем 12% ПААГ с ДСН. Как показано на фиг.6b, полоса DG Fc детектировалась в положении, которое соответствовало молекулярной массе нативного Fc, не содержащего сахарных групп.

#### <1-2> Количественный анализ белковых конъюгатов

Белковые конъюгаты, полученные, как описано в предыдущих примерах, количественно оценивали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке HiLoad 26/60 с Superdex 75 (Pharmacia) с использованием 10 мМ калийфосфатного буфера (рН 6,0) в качестве элюирующего буфера, где площадь пика каждого белкового конъюгата сравнивали с площадью пика контрольной группы.

Стандарты в предварительно определенном количестве, а именно IFN $\alpha$ , чГР, КГСФ, <sup>17</sup>Ser-КГСФ, ЕРО и Fc, отдельно подвергали эксклюзионной хроматографии и определяли переводной коэффициент между концентрацией и пиком. Каждый белковый конъюгат в предварительно определенном количестве снова подвергали эксклюзионной хроматографии. Затем путем вычитания площади пика, соответствующего Fc-фрагменту иммуноглобулина, из полученной площади пика определяли количество физиологически активного белка, присутствующего в каждом белковом конъюгате. На фиг.4 представлен результат эксклюзионной хроматографии очищенного конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc, где наблюдался один пик. Этот результат показал, что очищенный белковый конъюгат не содержит мультимерных примесей, таких как димер, тример или мономеры с большим числом звеньев.

После количественной оценки физиологически активного полипептида, конъюгированного с Fc, с использованием антитела против физиологически активного полипептида, было выявлено, что это антитело препятствует связыванию с этим полипептидом, на что указывало получение значения более низкого, чем фактическое значение, вычисленное с помощью хроматографии. В случае ELISA-анализа конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc этот анализ давал значение, составляющее примерно 30% от фактического значения.

#### <1-3> Оценка чистоты и массы белковых конъюгатов

Белковые конъюгаты, полученные, как описано в предыдущих примерах, подвергали эксклюзионной хроматографии и измеряли оптическую плотность при 280 нм. Результаты показали, что конъюгаты IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc, чГР-ПЭГ-Fc, КГСФ-ПЭГ-Fc и <sup>17</sup>Ser-КГСФ-ПЭГ-Fc обнаруживали один пик при времени удерживания вещества с молекулярной массой 70-80 кДа.

С другой стороны, проводили обращенно-фазовую ВЭЖХ для определения чистоты белковых конъюгатов, полученных, как описано в примерах 1, 11 и 13, а именно "IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc", "IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc" и "IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc". При этом использовали обращенно-фазовую колонку (колонка 259 VHP54, Vydac). Эту колонку элюировали 40-100% градиентом ацетонитрила с 0,5% TFA и чистоту анализировали путем измерения оптической плотности при 280 нм. Результаты, проиллюстрированные на фиг.8, показали, что образцы не содержали несвязанный интерферон или Fc-фрагмент иммуноглобулина, и было обнаружено, что все белковые конъюгаты IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc (A), IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc (B) и IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc (C) имели чистоту, превышающую 96%.

Для определения точных молекулярных масс очищенных белковых конъюгатов массу каждого конъюгата анализировали на высокоэффективном масс-спектрофотометре MALDI-TOF (Voyager De-STR, Applied Biosystems). В качестве матрикса использовали синаповую кислоту. 0,5 мкл каждого тест-образца наносили на предметное стекло и сушили воздухом, а затем снова смешивали с равным объемом матриксного раствора, сушили воздухом и вводили в источник ионов. Детекцию осуществляли с использованием линейного анализатора TOF, работающего в позитивном режиме. Ионы подвергали ускорению с использованием щелевого источника для вылета частиц с запаздыванием вылета (DE), где время запаздывания вылета частиц составляло от 750 нсек до 1500 нсек при общем напряжении ускорения примерно 2,5 кВ.

Молекулярные массы, наблюдаемые при масс-спектрометрии MALDI-TOF для белковых конъюгатов Fc, полученных, как описано в примерах, представлены ниже в таблице 1. На фиг.5 представлены результаты масс-спектрометрии MALDI-TOF для конъюгата ЕРО-ПЭГ-Fc, а на фиг.7 представлены результаты масс-спектрометрии MALDI-TOF для конъюгатов IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc и IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc. В результате было обнаружено, что белковый конъюгат ЕРО-ПЭГ-Fc имеет чистоту более чем 95% и молекулярную массу, очень близкую к теоретической Mw. Кроме того, было обнаружено, что ЕРО связывался с Fc-фрагментом иммуноглобулина в отношении 1:1.

| Таблица 1                                     |                        |                     |
|-----------------------------------------------|------------------------|---------------------|
|                                               | Теоретическая Mw (кДа) | Измеренная Mw (кДа) |
| IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc (E.1)                    | 75,4                   | 75,9                |
| чГР-ПЭГ-Fc (E.3)                              | 78,4                   | 78,6                |
| ГКСФ-ПЭГ-Fc (E.4)                             | 75,3                   | 75,9                |
| Производное <sup>17</sup> S-ГКСФ-ПЭГ-Fc (E.4) | 75,0                   | 75,9                |
| ЕРО-ПЭГ-Fc (E.5)                              | 91,4                   | 91,0                |

Кроме того, в результате оценки с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF молекулярных масс Fc и DG Fc, полученных, как описано в примере 10, было установлено, что DG Fc имеет молекулярную массу 50 кДа, которая примерно на 3 кДа меньше массы нативного Fc (фиг.6а). Поскольку Mw 3 кДа соответствует теоретическому размеру сахарных групп, то эти результаты продемонстрировали, что сахарные группы были полностью удалены.

В нижеследующей таблице 2 представлены результаты масс-спектрометрии MALDI-TOF конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc, полученного, как описано в примере 11, и конъюгатов IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc (I и II), полученных, как описано в примере 13. Было установлено, что конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc был на 3 кДа меньше, чем конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc, а конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc (I) был примерно на 3-4 кДа меньше, чем указанный конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc, имеющий массу 75,9 кДа. Конъюгат "IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc" (II), связанный с Fc-мономером, имел молекулярную массу, которая была меньше на 24,5 кДа, то есть на величину, соответствующую молекулярной массе мономера Fc.

| Таблица 2                                                      |                        |                     |
|----------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------|
|                                                                | Теоретическая Mw (кДа) | Измеренная Mw (кДа) |
| IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc (E.11)                                 | 72,8                   | 73,0                |
| IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc (I)(E.13)  | 72,3                   | 72,2                |
| IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc (II)(E.13) | 46,8                   | 46,6                |

### Экспериментальный пример 2: Фармакокинетический анализ

Нативные формы физиологически активных белков (контролей) и белковые конъюгаты, полученные, как описано выше в примерах и в сравнительных примерах, комплексы -40К ПЭГ, конъюгаты - ПЭГ-альбумин, конъюгаты - ПЭГ-Fc, конъюгаты - ПЭГ-DG Fc и конъюгаты - ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc оценивали на их стабильность в сыворотке и на фармакокинетические параметры у крыс SD (пять крыс на группу). Контроль, а также комплексы -40К ПЭГ, конъюгаты -ПЭГ-альбумин, конъюгаты -ПЭГ-Fc, конъюгаты -ПЭГ-DG Fc и конъюгаты -ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc (тест-группы) отдельно подкожно инъецировали крысам в дозе 100 мкг/кг. После подкожной инъекции через 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 30, 48, 72 и 96 часов брали пробы крови у животных контрольных групп, и через 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 240 и 288 часов брали пробы крови у животных тест-групп. Пробы крови собирали в пробирки с антикоагулянтом, гепарином, и центрифугировали в течение 5 минут в высокоскоростной микроцентрифуге Эппендорфа для удаления клеток крови. Уровни белка в сыворотке измеряли с помощью ELISA с использованием антител, специфичных к физиологически активным белкам.

Результаты фармакокинетических анализов нативных форм IFN $\alpha$ , чГР, ГКСФ и ЕРО и их -40К ПЭГ-комплексов, их -ПЭГ-альбумин-конъюгатов, -ПЭГ-Fc-конъюгатов и -ПЭГ-DG Fc-конъюгатов представлены ниже в таблицах 3-7. В нижеследующих таблицах  $T_{\max}$  означает время, необходимое для достижения максимальной концентрации лекарственного средства в сыворотке,  $T_{1/2}$  означает время полужизни лекарственного средства в сыворотке, а MRT (среднее время пребывания) означает среднее время пребывания молекулы лекарственного средства в организме.

Таблица 3  
Фармакокинетические данные интерферона-альфа

|                | Нативный IFN $\alpha$ | IFN $\alpha$ -40К ПЭГ (С.Е.1) | IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумин (С.Е.2) | IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc (Е.1) | IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc (Е.11) | IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc (I) (Е.13) | IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc (II) (Е.13) |
|----------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| $T_{\max}$ (ч) | 1,0                   | 3,0                           | 12                                 | 30                         | 48                             | 24                                                             | 24                                                              |
| $T_{1/2}$ (ч)  | 1,7                   | 35,8                          | 17,1                               | 90,4                       | 71,0                           | 61,2                                                           | 31,2                                                            |
| MRT (ч)        | 2,1                   | 71,5                          | 32,5                               | 150,1                      | 120,6                          | 111,0                                                          | 58,8                                                            |

Таблица 4  
Фармакокинетические данные человеческого фактора роста

|                | Нативный чГР | чГР-40К ПЭГ (С.Е.1) | чГР-ПЭГ-альбумин (С.Е.2) | чГР-ПЭГ-Fc (Е.3) |
|----------------|--------------|---------------------|--------------------------|------------------|
| $T_{\max}$ (ч) | 1,0          | 12                  | 12                       | 12               |
| $T_{1/2}$ (ч)  | 1,1          | 7,7                 | 5,9                      | 11,8             |
| MRT (ч)        | 2,1          | 18,2                | 13,0                     | 18,8             |

Таблица 5  
Фармакокинетические данные ГКСФ

|                | Нативный ГКСФ | ГКСФ-40К ПЭГ (С.Е.1) | ГКСФ-ПЭГ-альбумин (С.Е.2) | ГКСФ-ПЭГ-Fc (Е.4) |
|----------------|---------------|----------------------|---------------------------|-------------------|
| $T_{\max}$ (ч) | 2,0           | 12                   | 12                        | 12                |
| $T_{1/2}$ (ч)  | 2,8           | 4,8                  | 5,2                       | 6,9               |
| MRT (ч)        | 5,2           | 24,5                 | 25,0                      | 32,6              |

Таблица 6  
Фармакокинетические данные производного  $^{17}\text{S}$ -ГКСФ

|  | Производное нативного $^{17}\text{S}$ -ГКСФ | $^{17}\text{S}$ -ГКСФ-40К ПЭГ (С.Е.1) | $^{17}\text{S}$ -ГКСФ-ПЭГ-альбумин (С.Е.2) | $^{17}\text{S}$ -ГКСФ-ПЭГ-Fc (Е.4) |
|--|---------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|
|--|---------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|

|                                |              |                                         |                  |                                                  |
|--------------------------------|--------------|-----------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| $T_{\max}$ (ч)                 | 2,0          | 24                                      | 24               | 24                                               |
| $T_{1/2}$ (ч)                  | 2,9          | 4,3                                     | 6,4              | 7,0                                              |
| MRT (ч)                        | 5,8          | 24,4                                    | 25,1             | 33,2                                             |
| Таблица 7                      |              |                                         |                  |                                                  |
| Фармакокинетические данные ЕРО |              |                                         |                  |                                                  |
|                                | Нативный ЕРО | В высокой степени гликозилированный ЕРО | ЕРО-ПЭГ-Fc (Е.5) | ЕРО-ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc (Е.13) |
| $T_{\max}$ (ч)                 | 6,0          | 12                                      | 30               | 48                                               |
| $T_{1/2}$ (ч)                  | 9,4          | 18,4                                    | 61,5             | 87,9                                             |
| MRT (ч)                        | 21,7         | 26,8                                    | 117,6            | 141,6                                            |

Как видно из полученных результатов, представленных в таблице 3, и на графике фармакокинетических данных, представленном на фиг.9, белковый конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc имеет время полужизни в сыворотке 90,4 часа, и это время примерно в 50 раз выше, чем у нативного IFN $\alpha$ , и примерно в 2,5 раза выше, чем у комплекса IFN $\alpha$ -40К ПЭГ, имеющего время полужизни 35,8 часов и полученного, как описано в сравнительном примере 1. Кроме того, было обнаружено, что время полужизни в сыворотке белкового конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc настоящего изобретения значительно превышает время полужизни в сыворотке конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумин, которое составляет 17,1 часа.

С другой стороны, как показано в таблице 3 и на фиг.11, время полужизни конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc в сыворотке составляет 71,0 часа, т.е. почти аналогично времени полужизни конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc, что указывает на то, что дегликозилирование Fc не оказывает значительного влияния на *in vivo* стабильность конъюгата IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc. Кроме того, было обнаружено, что конъюгат, полученный с использованием производного рекомбинантного AG Fc, продуцированного рекомбинантным методом, обладает таким же эффектом, как и DG Fc, происходящий от нативной формы. Однако время полужизни в сыворотке комплекса, связанного с мономером Fc, было наполовину меньше, чем у комплекса, связанного с нормальным димером Fc.

Как показано в таблице 4, человеческий гормон роста, конъюгированный с Fc-фрагментом IgG настоящего изобретения, имел более длительное время полужизни в сыворотке. То есть, по сравнению с нативной формой (1,1 ч), комплекс чГР-40К ПЭГ и конъюгат чГР-ПЭГ-альбумин имели несколько более длительное время полужизни, составляющее 7,7 ч и 5,9 ч соответственно, а белковый конъюгат чГР-ПЭГ-Fc настоящего изобретения имел значительно более длительное время полужизни в сыворотке, которое составляло 11,8 ч.

Фармакокинетические данные для ГКСФ и его производных, представленные в таблице 5 и 6, показали, что конъюгаты ГКСФ-ПЭГ-Fc и <sup>17</sup>S-ГКСФ-ПЭГ-Fc обнаруживают гораздо большее время полужизни в сыворотке, чем комплекс -40К ПЭГ- и конъюгат -ПЭГ-альбумин. Было установлено, что Fc-фрагмент иммуноглобулина, присутствующий в сыворотке, способствовал увеличению продолжительности действия физиологически активных белков в нативных формах, а также в форме их производных, имеющих модификации в некоторых аминокислотных остатках, на уровне, аналогичном уровню нативных форм. Исходя из этих результатов, совершенно очевидно, что способ настоящего изобретения будет столь же эффективен и в отношении других белков и их производных.

Как показано в таблице 7 и на фиг.10, конъюгирование нативного гликозилированного ЕРО с Fc-фрагментом также приводит к увеличению времени

полужизни в сыворотке. То есть ЕРО, в своей нативной форме, имеет время полужизни в сыворотке 9,4 часа, а при высокой степени гликозилирования, способствующего увеличению его стабильности в сыворотке, он имел более длительное время полужизни в сыворотке, составляющее 18,4 часа. Конъюгат ЕРО-ПЭГ-Fc, содержащий ЕРО, присоединенный к Fc-фрагменту иммуноглобулина по настоящему изобретению, обнаруживал значительное увеличение времени полужизни в сыворотке, а именно до 61,5 часов. Кроме того, при конъюгировании с рекомбинантным агликозилированным (AG) Fc-производным, происходящим от E.coli, время полужизни ЕРО увеличивалось до 87,9 часов, что указывало на то, что агликозилирование Fc-фрагмента позволяет получить белковый конъюгат, не оказывающий нежелательного влияния на стабильность данного белка в сыворотке, т.е. этот Fc-фрагмент не обладал функциями антитела.

Исходя из вышеуказанных результатов, совершенно очевидно, что белковые конъюгаты настоящего изобретения, полученные путем ковалентного присоединения Fc-фрагмента иммуноглобулина посредством не-пептидного полимера, дают увеличение времени полужизни в сыворотке в несколько раз или в несколько десятков раз по сравнению со временем полужизни их нативных форм. Кроме того, если Fc иммуноглобулина был агликозилирован путем продуцирования в E.coli или дегликозилирован путем обработки ферментом, то указанное увеличение времени полужизни в сыворотке его белкового конъюгата поддерживалось на аналогичном уровне.

Более конкретно, по сравнению с белками, модифицированными 40 кДа-ПЭГ, который, среди других молекул ПЭГ, обеспечивал наиболее продолжительное действие этих белков в сыворотке, эти конъюгаты белка с Fc иммуноглобулина обнаруживали самую высокую стабильность в сыворотке. Кроме того, по сравнению с белковыми конъюгатами, которые, вместо Fc иммуноглобулина, имели присоединенный к ним альбумин, белковые конъюгаты настоящего изобретения обладали исключительно высокой стабильностью в сыворотке, что указывало на то, что белковые конъюгаты настоящего изобретения могут быть с успехом использованы для получения белковых лекарственных средств с пролонгированным действием. Эти результаты показали, что конъюгаты настоящего изобретения, по сравнению со стандартными белками, конъюгированными с ПЭГ или альбумином, дают превосходный эффект в отношении стабильности в сыворотке и MRT для белков широкого спектра, включая производные колониестимулирующего фактора, образованные точковой мутацией, что указывает на то, что такая стабильность и продолжительность действия белковых конъюгатов настоящего изобретения может быть достигнута и для других физиологически активных полипептидов.

С другой стороны, после получения белкового конъюгата IFN $\alpha$ -10K-ПЭГ-Fc (пример 7) с использованием не-пептидного полимера, 10 кДа-ПЭГ, этот конъюгат был проанализирован на время его полужизни в сыворотке методом, описанным выше, и полученные результаты показали, что его время полужизни в сыворотке составляло 48,8 часов, и это время было значительно короче, чем время полужизни (79,7 часов) белкового конъюгата, полученного с использованием 3,4 кДа-ПЭГ.

Кроме того, время полужизни белковых конъюгатов в сыворотке снижается с увеличением молекулярной массы не-пептидного полимера ПЭГ. Эти данные указывают на то, что самым главным фактором, способствующим увеличению стабильности в сыворотке и продолжительности действия белковых конъюгатов в сыворотке, является конъюгированный Fc-фрагмент иммуноглобулина, а не

не-пептидный полимер.

Даже если реакционноспособную группу ПЭГ заменить на другую реакционноспособную группу, не являющуюся альдегидной группой, то белковые конъюгаты с таким ПЭГ будут давать такие же эффекты в отношении кажущейся молекулярной массы и времени полужизни в сыворотке, как и конъюгаты, полученные с использованием ПЭГ, имеющего альдегидную реакционноспособную группу.

#### Экспериментальный пример 3: Фармакокинетический анализ II

Для определения времени полужизни в сыворотке конъюгатов Fab'-S-ПЭГ-N-Fc и Fab'-N-ПЭГ-N-Fc, полученных, как описано в примерах 8 и 9, и комплекса Fab'-S-40K ПЭГ, полученного, как описано в сравнительном примере 3, проводили фармакокинетический анализ лекарственных средств, полученных на основе указанных конъюгатов и указанного комплекса, методом, описанным в экспериментальном примере 2 с использованием Fab' в качестве контроля. Результаты представлены на фиг.12.

Как показано на фиг.12, конъюгаты Fab'-S-ПЭГ-N-Fc и Fab'-N-ПЭГ-N-Fc обнаруживали более длительное время полужизни в сыворотке, которое было в два или в три раза больше, чем время полужизни Fab' или комплекса Fab'-S-40K ПЭГ.

#### Экспериментальный пример 4: Оценка внутриклеточной активности белковых конъюгатов

<4-1> Сравнение внутриклеточных активностей конъюгатов белка IFN $\alpha$

Для сравнения внутриклеточной активности конъюгатов белка IFN $\alpha$  конъюгаты: IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc (пример 1), IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc (пример 11), IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc (пример 13), IFN $\alpha$ -40K ПЭГ (сравнительный пример 1) и IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумин (сравнительный пример 2) оценивали на противовирусную активность в биоанализе клеточных культур с использованием клеток коровьих почек Madin Darby (MDBK) (ATCC CCL-22), инфицированных вирусом везикулярного стоматита. В качестве стандартного материала использовали не-ПЭГилированный интерферон альфа-2b, поставляемый Национальным институтом по биологическим стандартам и контролю (NIBSC).

Клетки MDBK культивировали в среде MEM (минимальная поддерживающая среда, JBI), в которую были добавлены 10% FBS и 1% пенициллин/стрептомицин, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Анализируемые образцы и стандартный материал разводили культуральной средой в предварительно определенных концентрациях и 100 мкл-аликвоты этих разведений вносили в каждую лунку 96-луночного планшета. Культивированные клетки отделяли, добавляли в планшет, содержащий образцы в объеме 100 мкл, и культивировали примерно в течение 1 часа при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Затем в каждую лунку планшета добавляли 50 мкл вируса везикулярного стоматита (VSV) при  $5-7 \times 10^3$  б.о.е., после чего клетки культивировали примерно в течение 16-20 часов при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Лунку, которая не содержала образца или стандартного материала, а содержала лишь один вирус, использовали в качестве негативного контроля, а лунку, которая содержала только клетки, использовали в качестве позитивного контроля.

После удаления культуральной среды в планшет добавляли 100 мкл раствора нейтрального красного для окрашивания жизнеспособных клеток, а затем инкубировали в течение 2 часов при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После удаления супернатантов в каждую лунку планшета добавляли 100 мкл смеси 1:1 100% этанола

и 1% уксусной кислоты. После тщательного перемешивания для растворения всех кристаллов нейтрального красного, элюированного из окрашенных клеток, измеряли оптическую плотность при 540 нм. Негативный контроль использовали в качестве "пустышки", и вычисляли величины  $ED_{50}$  (дозы, вызывающие 50% ингибирование клеточного роста), принимая клеточный рост позитивного контроля за 100%.

| Таблица 8                                           |               |                             |                                                         |
|-----------------------------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------|
|                                                     | Конц. (нг/мл) | Удельная активность (МЕ/мг) | Относительная активность (%) для нативного IFN $\alpha$ |
| Нативный IFN $\alpha$                               | 100           | 4,24E+08                    | 100                                                     |
| IFN $\alpha$ -40К ПЭГ                               | 100           | 2,04E+07                    | 4,8                                                     |
| IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумин                          | 100           | 2,21E+07                    | 5,2                                                     |
| IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc                                | 100           | 1,19E+08                    | 28,1                                                    |
| IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc                             | 100           | 1,09E+08                    | 25,7                                                    |
| IFN $\alpha$ -ПЭГ-производное рекомбинантного AG Fc | 100           | 9,58E+07                    | 22,6                                                    |

Как показано в таблице 8, IFN $\alpha$ -40К ПЭГ давал уменьшение активности до 4,8% по отношению к активности нативного IFN $\alpha$ . В частности, по мере увеличения размера ПЭГ-части стабильность белкового конъюгата в сыворотке увеличивалась, а его активность постепенно снижалась. Сообщалось, что интерферон-альфа при его модификации 12 кДа-ПЭГ имеет *in vitro* активность 25%, а при его модификации 40 кДа-ПЭГ его активность составляет 7% (P. Bailon et al., Bioconjugate Chem. 12: 195-202, 2001). Таким образом, поскольку при увеличении молекулярной массы ПЭГ-части время полужизни белкового конъюгата увеличивается, а его биологическая активность резко снижается, то необходимо было получить такой белковый конъюгат, который имел бы более продолжительное время полужизни в сыворотке и более высокую активность. Кроме того, конъюгат IFN $\alpha$ -ПЭГ-альбумин имел слабую активность, которая составляла примерно 5,2% от активности нативного IFN $\alpha$ . В противоположность этому, конъюгаты IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc и IFN $\alpha$ -ПЭГ-DG Fc настоящего изобретения обнаруживали значительно более высокую относительную активность, которая составляла 28,1% и 25,7% по отношению к активности нативного IFN $\alpha$ . Кроме того, конъюгирование IFN $\alpha$  с производным рекомбинантного AG Fc приводило к аналогичному увеличению активности. Исходя из этих результатов, имеются все основания предполагать, что интерферон-альфа, конъюгированный с Fc-фрагментом иммуноглобулина, имеет значительно более длительное время полужизни в сыворотке и обладает значительно более высокой фармацевтической эффективностью *in vivo*.

<4-2> Сравнение внутриклеточных активностей конъюгатов белка человеческого гормона роста

Для сравнения внутриклеточной активности конъюгатов белка человеческого гормона роста проводили сравнительную оценку внутриклеточной активности конъюгатов чГР-ПЭГ-Fc, чГР-40К-ПЭГ и чГР-ПЭГ-альбумин.

Внутриклеточные активности конъюгатов чГР измеряли с помощью *in vitro* анализа с использованием клеточной линии нодулярной лимфомы крыс, Nb2 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC) #97041101), в которой наблюдался зависящий от человеческого гормона роста митогенез.

Клетки Nb2 культивировали в среде Фишера, в которую были добавлены 10% FBS (фетальной бычьей сыворотки), 0,075% NaCO<sub>3</sub>, 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ глутамина, после чего их 24 часа культивировали в той же самой среде, но не

содержащей 10% FBS. Затем культивированные клетки подсчитывали и в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли примерно  $2 \times 10^4$ -аликвоты клеток. Затем конъюгат чГР-ПЭГ-Fc, конъюгат чГР-40К ПЭГ, конъюгат чГР-ПЭГ-альбумин (стандартные конъюгаты, поставляемые Национальным институтом по биологическим стандартам и контролю (NIBSC)), используемые в качестве контроля, и нативный человеческий гормон роста (НМ-чГР) разводили и добавляли в каждую лунку при различных концентрациях с последующим инкубированием в течение 48 часов при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После этого, для измерения пролиферативной активности клеток путем определения числа клеток в каждой лунке, в каждую лунку добавляли 25 мкл 1х водного раствора реагента 96 для определения клеточного титра (Promega) и клетки снова культивировали в течение 4 часов. Затем измеряли оптическую плотность при 490 нм и подсчитывали титр для каждого образца. Результаты представлены ниже в таблице 9.

| Таблица 9                                                                                                                                                                |               |                             |                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                          | Конц. (нг/мл) | Удельная активность (МЕ/мг) | Относительная активность (%) для нативного НМ-чГР |
| Нативный чГР                                                                                                                                                             | 100           | 2,71E+06                    | 100                                               |
| чГР (стандарт от NIBSC)                                                                                                                                                  | 100           | 2,58E+06                    | 95,2                                              |
| чГР-40К ПЭГ                                                                                                                                                              | 100           | 0,206E+06                   | 7,6                                               |
| чГР-ПЭГ-альбумин                                                                                                                                                         | 100           | 0,141E+06                   | 5,2                                               |
| чГР-ПЭГ-Fc                                                                                                                                                               | 100           | 0,76E+06                    | 28,1                                              |
| Удельная активность*=1/ED <sub>50</sub> × 10 <sup>6</sup> (ED <sub>50</sub> : количество белка, необходимого для стимуляции 50%-го роста от максимального роста клеток). |               |                             |                                                   |

Как показано в таблице 9, в случае человеческого гормона роста конъюгирование с 40-кДа ПЭГ (чГР-40К ПЭГ) также приводило к снижению активности примерно до 7,6% по отношению к активности нативной формы, а конъюгат чГР-ПЭГ-альбумин обнаруживал низкую *in vitro* активность, которая составляла примерно 5,2% от активности нативного чГР. Однако конъюгат чГР-ПЭГ-Fc настоящего изобретения обнаруживал увеличение относительной активности до более чем 28% по отношению к активности нативного чГР. Исходя из этих результатов, имеются все основания предполагать, что человеческий гормон роста, конъюгированный с Fc-фрагментом иммуноглобулина, имеет значительно более длительное время полужизни в сыворотке и обладает значительно более высокой фармацевтической эффективностью *in vivo*. Кроме того, очевидно, что повышенная активность белковых конъюгатов Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению обусловлена увеличением их стабильности в сыворотке и сохранением аффинности связывания с рецепторами благодаря присутствию Fc иммуноглобулина или наличию пространства, образованного не-пептидным полимером. Поэтому можно предположить, что такими эффектами также обладают белковые конъюгаты Fc-фрагмента иммуноглобулина, связанного с другими физиологически активными белками.

#### <4-3> Сравнение внутриклеточных активностей конъюгатов белка ГКСФ

Для сравнения внутриклеточных активностей белковых конъюгатов с производным ГКСФ проводили сравнение внутриклеточной активности нативного ГКСФ (Filgrastim, Jell Pharm. Co., Ltd.), <sup>17</sup>Ser-ГКСФ-производного, 20К ПЭГ-ГКСФ (Neulasta), 40К ПЭГ-<sup>17</sup>Ser-ГКСФ, <sup>17</sup>Ser-ГКСФ-ПЭГ-альбумин и <sup>17</sup>S-ГКСФ-ПЭГ-Fc.

Сначала человеческую миелоидную клеточную линию HL-60 (ATCC CCL-240, пациентка с промиелоцитарным лейкозом/36-летняя женщина индоевропейской расы)

культивировали в среде RPMI 1640, в которую было добавлено 10% FBS.

Культивированные клетки суспендировали при плотности примерно  $2,2 \times 10^5$  клеток/мл и добавляли ДМСО (диметилсульфоксид со степенью чистоты, пригодной для культивирования, Sigma) при конечной концентрации 1,25% (об./об.). Затем 90 мкл клеточной суспензии высевали в каждую лунку 96-луночного планшета (Corning/96-луночный планшет с выпариванием при низкой температуре), после чего планшет оставляли до достижения плотности примерно  $2 \times 10^4$  клеток на лунку и культивировали в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение примерно 72 часов.

Каждый образец, в котором концентрация белка была определена с использованием набора для ELISA ГКСФ (R&D systems), разводили средой RPMI 1640 до идентичной концентрации 10 мкг/мл, а затем проводили двукратное разведение средой RPMI девятнадцать раз. Эти серийные двукратные разведения отдельно добавляли в каждую лунку, содержащую клетки HL-60 в объеме 10 мкл, так, чтобы концентрация каждого образца изначально составляла 1 мкг/мл. Затем клетки культивировали в инкубаторе при 37°C в течение 72 часов.

Пролиферацию клеток HL-60 анализировали с использованием реагента 96 для определения клеточного титра (Cell Titer 96<sup>TM</sup> (Cat. NO G4100, Promega), и увеличивающееся число клеток определяли путем измерения оптической плотности при 670 нМ.

| Таблица 10                          |                          |                                                 |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|
|                                     | ED <sub>50</sub> (МЕ/мг) | Относительная активность (%) для нативного ГКСФ |
| Нативный ГКСФ                       | 0,30                     | 100                                             |
| <sup>17</sup> Ser-ГКСФ              | 0,26                     | 115                                             |
| ГКСФ-20К ПЭГ (Neulasta)             | 1,20                     | 25                                              |
| <sup>17</sup> Ser-ГКСФ-40К ПЭГ      | 10,0                     | <10,0                                           |
| <sup>17</sup> Ser-ГКСФ-ПЭГ-альбумин | 1,30                     | 23,0                                            |
| <sup>17</sup> Ser-ГКСФ-ПЭГ-Fc       | 0,58                     | 51,7                                            |

Как показано в таблице 10, белковые конъюгаты Fc иммуноглобулина и производного ГКСФ, имеющие аминокислотную замену, <sup>17</sup>Ser-ГКСФ, также обнаруживали такие же эффекты, как и нативные белковые ГКСФ-конъюгаты. Ранее уже сообщалось, что <sup>17</sup>Ser-ГКСФ-ПЭГ имел относительно более длительное время полужизни в сыворотке, но более низкую активность по сравнению с не-ПЭГилированным <sup>17</sup>Ser-ГКСФ (публикация выложенной корейской патентной заявки № 2004-82268). Более конкретно, по мере увеличения размера ПЭГ-части стабильность белкового конъюгата в сыворотке увеличивалась, а его активность постепенно снижалась. <sup>17</sup>Ser-ГКСФ-40К ПЭГ обнаруживал очень низкую активность, которая составляла примерно менее 10% от активности нативной формы. Таким образом, поскольку при увеличении молекулярной массы ПЭГ-части время полужизни белкового конъюгата в сыворотке увеличивается, а его биологическая активность резко снижается, то необходимо получить такой белковый конъюгат, который имел бы более длительное время полужизни в сыворотке и более высокую активность. Конъюгат <sup>17</sup>Ser-ГКСФ-ПЭГ-альбумин также обнаруживал слабую активность, которая составляла примерно 23% от активности нативного ГКСФ. В противоположность этому, конъюгат <sup>17</sup>Ser-ГКСФ-ПЭГ-Fc обладал значительно более

высокой относительной активностью, которая составляла более чем 51% от активности нативного ГКСФ. Исходя из этих результатов, имеются все основания предполагать, что <sup>17</sup>Ser-ГКСФ, конъюгированный с Fc-фрагментом иммуноглобулина, имеет значительно более длительное время полужизни в сыворотке и обладает значительно более высокой фармацевтической эффективностью *in vivo*.

#### <4-4> Анализ на нейтрализацию цитотоксичности Fab'-конъюгатов

Анализ на активность *in vitro* проводили с использованием конъюгатов Fab'-S-ПЭГ-N-Fc и Fab'-N-ПЭГ-N-Fc, полученных, как описано в примерах 8 и 9, и комплекса Fab'-S-40К ПЭГ, полученного, как описано в сравнительном примере 3. В процессе анализа на цитотоксичность, проводимого путем измерения TNF $\alpha$ -опосредованной цитотоксичности, оценивали Fab'- конъюгаты для того, чтобы определить, нейтрализуют ли указанные конъюгаты TNF $\alpha$ -индуцированный апоптоз в клеточной линии мышиных фибробластов, L929 (ATCC CRL-2148).

Конъюгаты Fab'-S-ПЭГ-N-Fc и Fab'-N-ПЭГ-N-Fc и комплекс Fab'-S-40К ПЭГ подвергали срийному двукратному разведению и в лунки 96-луночного планшета добавляли 100 мкл-аликвоты. rhTNF- $\alpha$  (R&D Systems) и актиномицин D (Sigma), используемый в качестве ингибитора синтеза РНК при конечных концентрациях 10 нг/мл и 1 мкг/мл соответственно, добавляли в каждую лунку, а затем инкубировали в течение 30 минут в инкубаторе при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> и переносили в микропланшет для анализа. В каждую лунку добавляли клетки L929 при плотности 5 × 10<sup>4</sup> клеток/50 мкл среды и культивировали в течение 24 часов в инкубаторе при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. После удаления культуральной среды в каждую лунку добавляли 50 мкл МТТ (Sigma), растворенного в PBS при концентрации 5 мг/мл, и клетки культивировали примерно в течение 4 часов в инкубаторе при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Затем в каждую лунку добавляли 150 мкл ДМСО и определяли степень нейтрализации цитотоксичности путем измерения оптической плотности при 540 нм. В качестве контроля использовали Fab', очищенный в стадии 1 примера 8.

Как показано на фиг.13, все белковые конъюгаты, используемые в этом тесте, имели такой же титр, как и Fab'. Эти результаты показали, что если белковый конъюгат получали путем присоединения Fc иммуноглобулина к свободному цистеиновому остатку у N-конца или у C-конца Fab' посредством ПЭГ, то Fab' имел значительно более длительное время полужизни в сыворотке и обладал высокой активностью *in vivo*.

#### <4-5> Анализ на комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC)

Для того, чтобы определить, связываются ли производные, полученные, как описано в примерах, и белки, соответствующие константным областям иммуноглобулинов, которые были экспрессированы в трансформантах E.coli или очищены, с человеческим C1q, проводили твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) в соответствии с нижеописанной процедурой. В качестве тест-групп были использованы константные области иммуноглобулина, полученные с использованием трансформантов НМ10932 и НМ10927 и депонированные в Корейском центре культур микроорганизмов (KCCM) 15 сентября 2004 под регистрационными номерами KCCM-10597 и KCCM-10598, и производные, полученные, как описано в предыдущих примерах. В качестве стандартов были использованы гликозилированный иммуноглобулин (IVIg-глобулин S, Green Cross RBM) и несколько коммерчески доступных антител, применяемых в качестве терапевтических антител. Тестируемые и стандартные образцы приготавливали в 10

мМ карбонатного буфера (рН 9,6) при концентрации 1 мкг/мл. Образцы разделяли на аликвоты и вносили в 96-луночный планшет (Nunc) в количестве 200 нг на лунку и планшет оставляли на ночь при 4°C для сенсибилизации. Затем каждую лунку три раза промывали PBS-T (137 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% твина-20), блокировали 250 мкл блокирующего буфера (1% альбумина бычьей сыворотки в PBS-T) при комнатной температуре в течение ночи, после чего снова три раза промывали тем же самым PBS-T. Стандартные и тестируемые образцы разводили PBS-T до предварительно определенной концентрации и добавляли в сенсибилизированные антителами лунки и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, а затем три раза промывали PBS-T. После этого в планшет добавляли 2 мкг/мл Clq (R&D Systems) и этот планшет оставляли для реакции на 2 часа при комнатной температуре, а затем шесть раз промывали PBS-T. Затем в каждую лунку добавляли 200 мкл, при 1:1000-разведении, конъюгата "человеческая пероксидаза-антитело против человеческого Clq" (Biogenesis, USA) в блокирующем буфере и оставляли для реакции на 1 час при комнатной температуре. После трехкратной промывки каждой лунки PBS-T равные объемы окрашивающих реагентов А и В смешивали (окрашивающий реагент А: стабилизированная пероксидаза; и окрашивающий реагент В: стабилизированный хромоген; DY 999, R&D Systems), а затем в каждую лунку добавляли 200 мкл смеси и смесь инкубировали в течение 30 минут. После этого в каждую лунку добавляли 50 мкл раствора 2М серной кислоты для завершения реакции. Планшет считывали с использованием микропланшет-ридера (Molecular Device). Оптическую плотность стандартных и тестируемых образцов измеряли при 450 нм, и полученные результаты были систематизированы на фиг.14 и 15 соответственно.

При сравнении подклассов иммуноглобулина на предмет активности их Fc-фрагментов по отношению к комплементу самая высокая аффинность связывания с C1q наблюдалась для человеческого иммуноглобулина IgG1 (Fitzgerald), более низкая - в IgG2 (Fitzgerald), а еще более низкая - в IgG4 (Fitzgerald), что указывало на различие в активностях этих подклассов по отношению к комплементу. IVIG, используемый в этом тесте и представляющий собой пул подклассов IgG, обладал почти такой же аффинностью связывания с C1q, как и очищенный IgG1, поскольку IVIG, в основном, состоит из IgG1. По сравнению с этими стандартами, с точки зрения изменения аффинности связывания с C1q при агликозилировании, активность Fc IgG1, обладающего наиболее сильной активностью по отношению к комплементу, заметно снижалась. Fc IgG4, который, как известно, не индуцирует активацию комплемента, в очень редких случаях обладал аффинностью связывания с C1q, что указывает на то, что Fc IgG4 может быть использован как превосходный рекомбинантный носитель, не обладающий активностью по отношению к комплементу (фиг.14).

Для того, чтобы определить, сохраняет ли данный носитель присущее ему отсутствие аффинности связывания с C1q даже после его конъюгирования с физиологически активным пептидом, были получены конъюгаты IFN-альфа-Fc с использованием гликозилированного Fc, ферментативно дегликозилированного Fc и агликозилированного рекомбинантного Fc в качестве носителей для IFN-альфа, и эти конъюгаты оценивали на их аффинность связывания с C1q. Гликозилированный конъюгат IFN-альфа с присоединенным к нему Fc (IFN $\alpha$ -ПЭГ-Fc: гликозилированный IgG1Fc) сохранял высокую аффинность связывания с C1q. В противоположность этому, если интерферон-альфа присоединен к Fc, который был

дегликозилирован с использованием PNGазы F и других ферментов, то полученный конъюгат (IFN $\alpha$ -ПЭГ-DGFC: дегликозилированный IgG1Fc) обнаруживал значительно более низкую аффинность связывания с C1q, которая была аналогична аффинности происходящего от E.coli конъюгата агликозилированного Fc. Кроме того, в случае, когда IgG1-часть конъюгата агликозилированного IgG1 с Fc, присоединенным к интерферону-альфа (IFN $\alpha$ -ПЭГ-AGFCG1: агликозилированный IgG1Fc), заменяли на IgC4-часть, то полученный конъюгат интерферона (IFN $\alpha$ -ПЭГ-FcG4, производное 1: агликозилированный IgG4Fc) обнаруживал полную потерю своей аффинности связывания с C1q. Если IgG1-Fc-часть заменяли на мономер Fc IgG4, то полученный конъюгат (IFN $\alpha$ -ПЭГ-FcG4, производное 2: агликозилированный IgG4Fc) также обнаруживал полную потерю своей аффинности связывания с C1q. Эти результаты показали, что такие формы Fc-фрагмента IgG4 могут быть использованы в качестве превосходных носителей, у которых отсутствуют эффекторные функции, присущие фрагментам антител (фиг.15).

#### Экспериментальный пример 5: Измерение относительной активности ЕРО-ПЭГ-Fc

<5-1> Измерение относительной активности BRP-ЕРО относительно ЕРО-ПЭГ-Fc

Биологическую активность конъюгата ЕРО-ПЭГ-Fc измеряли способом, описанным в европейской фармакопее (ЕР). Мышам с моделью гипоксии, BDF-1, вводили ЕРО-ПЭГ-Fc в 3 различных концентрациях, а затем измеряли повышение количества ретикулоцитов в крови для оценки относительной активности ЕРО-ПЭГ-Fc относительно BRP-ЕРО.

Биологическая активность конъюгата ЕРО-ПЭГ-Fc составила 6580000 Ед/мг по концентрации ЕРО. Также биологическая активность составляла 248000 Ед/мг по концентрации всего белка. Таким образом, биологическая активность ЕРО-ПЭГ-Fc была значительно выше, чем активность ЕРО (>100000 Ед/мг).

#### <5-2>Тест PD in vivo

Измеряли изменение концентрации ретикулоцитов после однократного введения конъюгата ЕРО-ПЭГ-Fc крысам SD. Крысам RD вводили одинаковое количество природного ЕРО (Recormon, Roche) и в качестве контроля высокогликозилированный ЕРО (Aranesp, Amgen) соответственно и вводили ЕРО-ПЭГ-Fc в том же количестве, что нативный ЕРО и высокогликозилированный ЕРО, и 1/10 указанного количества ЕРО-ПЭГ-Fc. Результаты показаны на фиг.16.

В результате у группы, которой вводили ЕРО-ПЭГ-Fc в количестве 1/10 нативного ЕРО и высокогликозилированный ЕРО, отмечали сходное повышение концентрации ретикулоцитов с концентрацией группы, которой вводили природный ЕРО и высокогликозилированный ЕРО. Кроме того, у группы, которой вводили ЕРО-ПЭГ-Fc в том же количестве, что и природный ЕРО и высокогликозилированный ЕРО, отмечали аналогичное повышение концентрации ретикулоцитов, но время возвращения к нормальной концентрации ретикулоцитов было в 10 раз длиннее, чем у природного ЕРО и высокогликозилированного ЕРО. Следовательно, эти результаты указывают, что ЕРО-ПЭГ-Fc в 10 раз сильнее, чем природный ЕРО и высокогликозилированный ЕРО.

#### Экспериментальный пример 6: Тест на повышение массы

Измеряли биологическую активность конъюгата hGH-ПЭГ-Fc. Крысам с удаленным гипофизом вводили природный hGH-ПЭГ-Fc и затем измеряли повышение веса.

Конкретно, ежедневно вводили 300 мкг/кг rhGH в течение 12 суток (общее введенное количество: 3600 мкг/кг) в качестве контроля. Также вводили 600

мкг/кг hGH-ПЭГ-Fc два раза в течение 12 суток (общее введенное количество: 1200 мкг/кг) и 300 мкг/кг hGH-ПЭГ-Fc четыре раза в течение 12 суток (общее введенное количество: 1200 мкг/кг). Результаты показаны на фиг.17.

В результате в группе, которой вводили hGH-PEG-Fc в количестве 1/3 природного hGH 1 раз в течение 6 дней, отмечали сходное изменение веса, как в группе, которой вводили природный hGH. Кроме того, у группы, которой вводили hGH-PEG-Fc в количестве 1/3 природного hGH 2 раза в течение 6 дней, отмечали большее повышение массы, чем в группе, получавшей природный hGH.

Следовательно, эти результаты указывают, что биологическая активность hGH-PEG-Fc в 6-раз выше активности природного.

Экспериментальный пример 7: Конъюгат IFN альфа-2a (HM10660A) с повышенной продолжительностью действия

В этом эксперименте измеряли in vivo активность конъюгата IFN альфа-2a (IFN-PEG-Fc) с повышенной продолжительностью действия. Клетки SK-OV-3 (раковые клетки яичника человека) трансплантировали мышам nude. Мышам nude вводили 30 мкг/кг нативного IFN альфа-2a, 5 дней/неделя в течение 4 недель. Другим мышам nude вводили 30 или 150 мкг/кг IFN-PEG-Fc (HM10660A) один раз в неделю в течение 4 недель. Измеряли способность ингибировать рост раковых клеток.

Как показано на фиг.18, активность конъюгата IFN-PEG-Fc по настоящему изобретению выше физиологической активности природного IFN.

Экспериментальный пример 8: Конъюгат G-CSF (HM10460A) с повышенной продолжительностью действия

В этом эксперименте измеряли in vivo активность конъюгата G-CSF (G-CSF-PEG-Fc) с повышенной продолжительностью действия. Модель нейтропении получали путем введения противоопухолевого средства CPA у мышей CD-1. Через 2 дня после введения CPA мышам с моделью нейтропении однократно вводили 200 мкг/кг G-CSF-PEG-Fc (HM10460A). В сравнительном эксперименте другим мышам с моделью нейтропении вводили 50 мкг/кг/день филграстим (природный G-CSF) в течение 4 последовательных дней. Затем измеряли повышение ANC в каждой группе.

Как показано на фиг.19, конъюгат G-CSF-PEG-Fc по настоящему изобретению имел гораздо большую активность по сравнению с физиологической активностью природного G-CSF.

Промышленное применение

Как описано выше, белковый конъюгат по настоящему изобретению значительно увеличивает время полужизни в плазме полипептидных лекарственных средств до уровней, превышающих время полужизни любых стандартных модифицированных белков. С другой стороны, использование белковых конъюгатов позволяет устранить большинство значительных недостатков, присущих стандартным композициям пролонгированного действия, путем снижения титров лекарственных средств и, тем самым, увеличения их времени пребывания в кровотоке и увеличения in vivo активности этих белковых конъюгатов по сравнению с альбумином, который, как ранее считалось, является наиболее эффективным. Кроме того, при использовании белковых конъюгатов риск индуцирования иммунных ответов отсутствует. Благодаря этим преимуществам указанные белковые конъюгаты могут быть использованы для изготовления белковых лекарственных препаратов пролонгированного действия. В соответствии с настоящим изобретением белковые лекарственные препараты пролонгированного действия способны ослаблять боли у пациентов, возникающих при частых инъекциях, а также поддерживать соответствующие концентрации

активных полипептидов в сыворотке в течение длительного периода времени и, тем самым, обеспечивать стабильную фармацевтическую эффективность.

Кроме того, описанный способ получения белковых конъюгатов позволяет решить проблемы, связанные с продуцированием гибридных белков путем генетических манипуляций, включая трудности, связанные с получением экспрессионных систем и гликозилированием в различных нативных формах; с риском индуцирования иммунного ответа; с ограниченной ориентацией белкового гибрида и с низкими выходами, обусловленными неспецифическими реакциями, а также проблемы, связанные с химическим синтезом, такие как токсичность химических соединений, используемых в качестве связующих агентов, а поэтому указанный способ получения белковых лекарственных средств с более длительным временем полужизни в сыворотке и с высокой активностью является экономически выгодным.

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

**INTERNATIONAL FORM**

To Kyung-yoon Min

Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd.

893-3, Hajeo-ri, Paltan-myeon, Hwaseong-si,  
Gyeonggi-do, Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

|                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                               |
| Identification reference given by the<br>DEPOSITOR :<br>HM10932                                                                                                                                                          | Accession number given by the<br>INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:<br>KCCM-10597                                                                            |
| <b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                               |
| The microorganism identified under I above was accompanied by:<br><input type="checkbox"/> a scientific description<br><input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation<br>(Mark with a cross where applicable) |                                                                                                                                                               |
| <b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                               |
| This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on Sep. 15, 2004. (date of the original deposit) <sup>1</sup>                                       |                                                                                                                                                               |
| <b>IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                               |
| Name : Korean Culture Center of Microorganisms<br><br>Address : 361-221, Yurim B/D<br>Hongje-1-dong,<br>Seodaemun-gu<br>SEOUL 120-091<br>Republic of Korea                                                               | Signature(s) of person(s) having the power<br>to represent the International Depositary<br>Authority or of authorized official(s):<br><br>Date: Sep. 21, 2004 |

<sup>1</sup> Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of International Depositary Authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

Form BP/4

Sole page

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

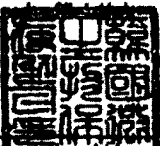
**INTERNATIONAL FORM**

To. Kyung-yoon Min

Hannu Pharmaceutical Co., Ltd.

888-3, Hajeo-ri, Paltan-myeon, Hwasong-si,  
Gyeonggi-do, Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

|                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Identification reference given by the<br>DEPOSITOR :<br>HM10927                                                                                                                    | Accession number given by the<br>INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:<br>KCCM-10588                                                                                                                                                                  |
| <b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| The microorganism identified under I above was accompanied by:                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <input type="checkbox"/> a scientific description<br><input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation<br>(Mark with a cross where applicable)                             |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on Sep. 15, 2004. (date of the original deposit) <sup>1</sup> |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Name : Korean Culture Center of Microorganisms<br><br>Address : 361-221, Yurim B/D<br>Hongje-1-dong,<br>Seodaemun-gu<br>SEOUL 120-091<br>Republic of Korea                         | Signature(s) of person(s) having the power<br>to represent the International Depositary<br>Authority or of authorized official(s)<br><br>Date: Sep. 21, 2004.  |

<sup>1</sup> Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

Form BP/4

Sole page

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

**INTERNATIONAL FORM**

To: Kyung-yoon Min

Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd.

893-3, Hajeo-ri, Paltan-myeon, Hwaseong-si,

Gyeonggi-do, Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

|                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                              |
| Identification reference given by the<br>DEPOSITOR :<br>HM10933                                                                                                                                                          | Accession number given by the<br>INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:<br>KCCM-10598                                                                           |
| <b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                              |
| The microorganism identified under I above was accompanied by:<br><input type="checkbox"/> a scientific description<br><input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation<br>(Mark with a cross where applicable) |                                                                                                                                                              |
| <b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                              |
| This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was<br>received by it on Sep. 15. 2004. (date of the original deposit) <sup>1</sup>                                    |                                                                                                                                                              |
| <b>IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                              |
| Name : Korean Culture Center of Microorganisms<br><br>Address : 361-221, Yurim B/D<br>Hongje-1-dong,<br>Seodaemun-gu<br>SEOUL 120-091<br>Republic of Korea                                                               | Signature(s) of person(s) having the power<br>to represent the International Depositary<br>Authority or of authorized official(s)<br><br>Date: Sep. 21. 2004 |

<sup>1</sup> Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

Form BP/4

Sole page

Формула изобретения

1. Способ увеличения продолжительности действия физиологически активного полипептида *in vivo*, отличающийся тем, что физиологически активный полипептид конъюгируют с Fc-фрагментом иммуноглобулина посредством PEG.

2. Способ по п.1, где указанный Fc-фрагмент иммуноглобулина является агликозилированным.

3. Способ по п.1, где указанный Fc-фрагмент иммуноглобулина состоит из 1-4 доменов, выбранных из группы, состоящей из доменов C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3 и C<sub>H</sub>4.

4. Способ по п.3, где указанный Fc-фрагмент иммуноглобулина дополнительно

содержит шарнирную область.

5. Способ по п.1, где указанный Fc-фрагмент иммуноглобулина выбран из группы, состоящей из Fc-фрагментов IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, их комбинаций и гибридов.

6. Способ по п.5, где указанный Fc-фрагмент иммуноглобулина выбран из группы, состоящей из Fc-фрагментов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, их комбинаций и гибридов.

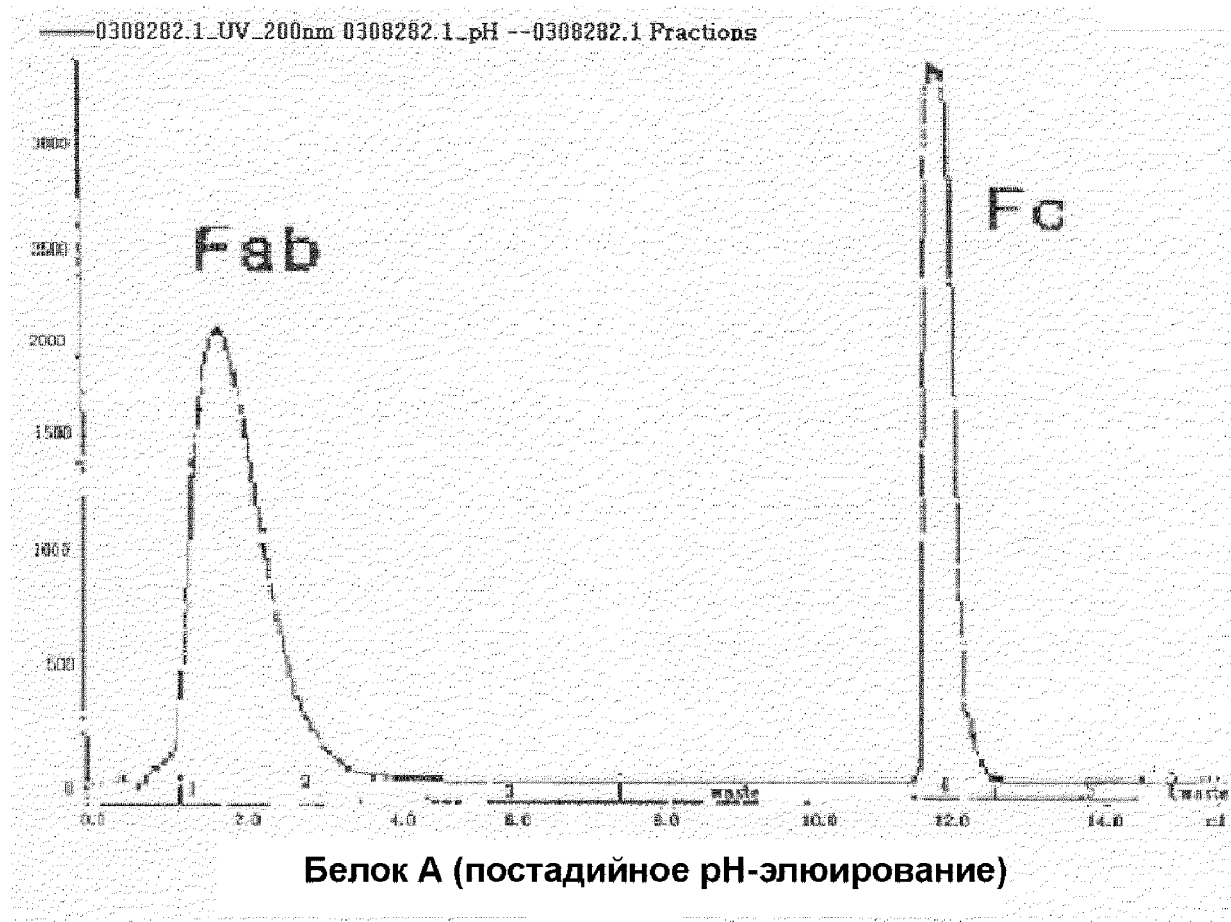
7. Способ по п.6, где указанным Fc-фрагментом иммуноглобулина является Fc-фрагмент IgG4.

8. Способ по п.7, где указанным Fc-фрагментом иммуноглобулина является Fc-фрагмент агликозилированного IgG4 человека.

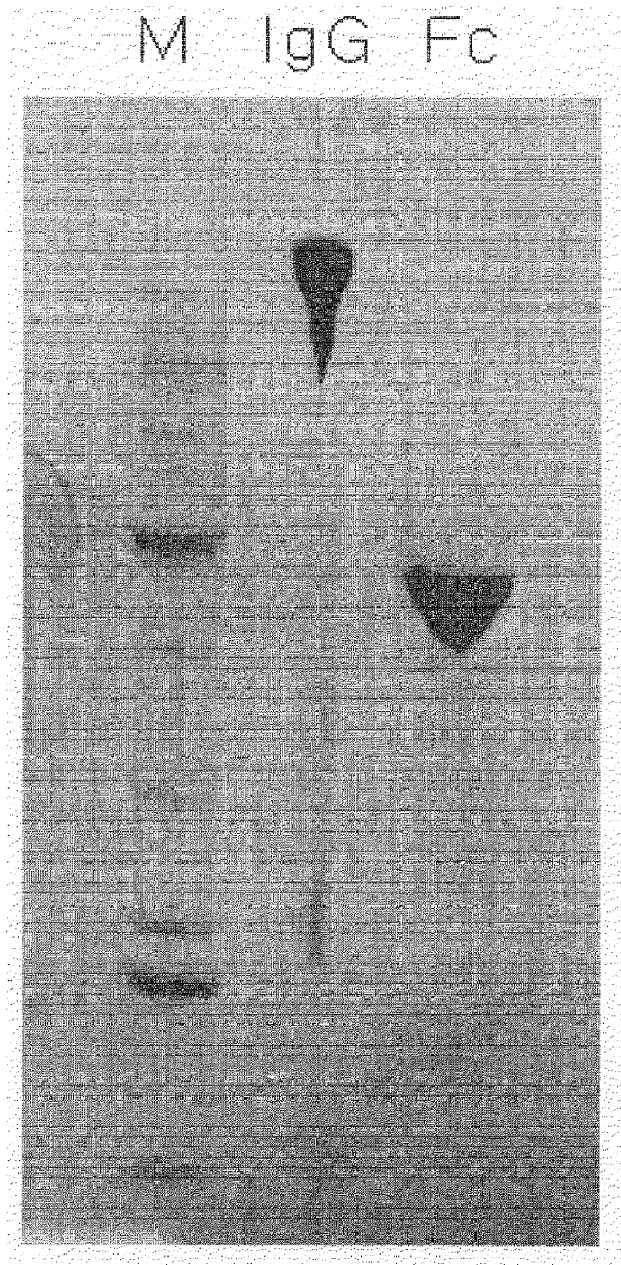
9. Способ по п.1, где указанный физиологически активный полипептид выбран из группы, состоящей из гормонов, цитокинов, ферментов, антител, факторов роста, факторов регуляции транскрипции, факторов свертывания крови, из вирусных вакцинных антигенов, структурных белков, белков-лигандов и рецепторов.

10. Способ по п.9, где указанный физиологически активный полипептид выбран из группы, состоящей из гормона роста человека, рилизинг-фактора гормона роста, пептида, высвобождающего гормон роста, интерферонов, рецепторов интерферона, колониестимулирующих факторов, глюкагоноподобных пептидов, рецептора, связанного с G-белком, интерлейкинов, рецепторов интерлейкинов, ферментов, интерлейкинсвязывающих белков, цитокинсвязывающих белков, фактора активации макрофагов, пептида макрофага, В-клеточного фактора, Т-клеточного фактора, белка А, ингибитора аллергии, гликопротеинов некроза клеток, иммунотоксина, лимфотоксина, фактора некроза опухоли, супрессоров опухолей, метастатического фактора роста, антитрипсина альфа-1, альбумина, альфа-лактальбумина, аполипопротеина-Е, эритропоэтина, высокогликозилированного эритропоэтина, ангиопоэтинов, гемоглобина, тромбина, пептида, активирующего рецептор тромбина, тромбомодулина, фактора VII, фактора VIIa, фактора VIII, фактора IX, фактора XIII, фактора активации плазминогена, фибринсвязывающего пептида, урокиназы, стрептокиназы, гирудина, белка С, С-реактивного белка, ингибитора ренина, ингибитора коллагеназы, супероксиддисмутазы, лептина, тромбоцитарного фактора роста, эпителиального фактора роста, эпидермального фактора роста, ангиостатина, ангиотензина, фактора роста костей, белка, стимулирующего рост костей, кальцитонина, инсулина, атриопептина, фактора, индуцирующего образование хряща, элкатонина, фактора активации соединительной ткани, ингибитора пути тканевого фактора, фолликуло-стимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона, факторов роста нервной ткани, паратиреоидного гормона, релаксина, секретина, соматомедина, инсулиноподобного фактора роста, адренокортикоидного гормона, глюкагона, холецистокинина, панкреатического полипептида, пептида, высвобождающего гастрин, рилизинг-фактора кортикотропина, тиреоидстимулирующего гормона, аутоксина, лактоферрина, миостатина, рецепторов, антагонистов рецепторов, антигенов клеточной поверхности, вирусных вакцинных антигенов, моноклональных антител, поликлональных антител и фрагментов антител.

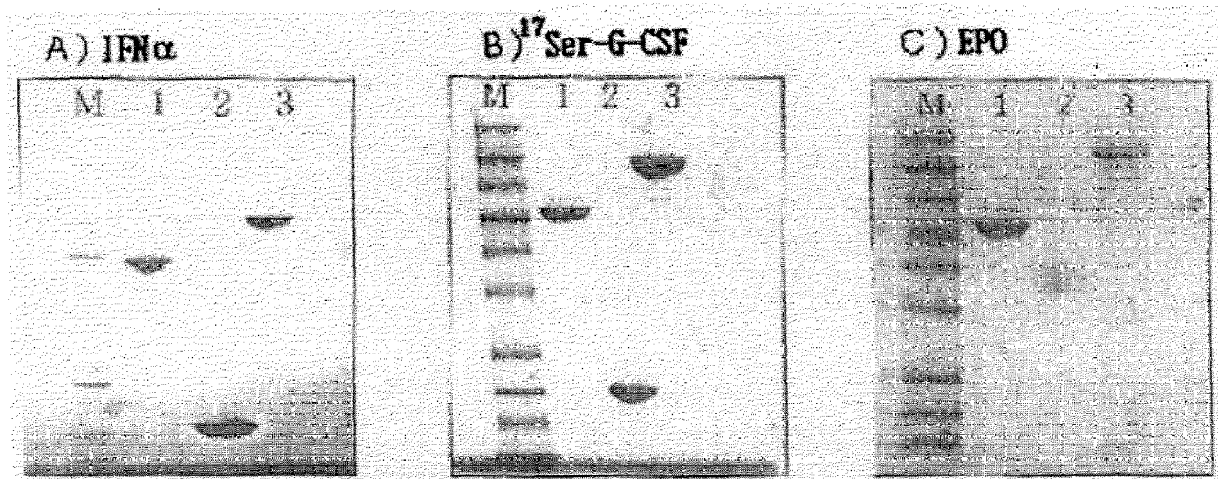
11. Способ по п.10, где указанный физиологически активный полипептид выбран из группы, состоящей из гормона роста человека, колониестимулирующего фактора, интерферона-альфа, эритропоэтина человека и Fab'-фрагмента антитела.



Фиг. 1



**Фиг. 2**



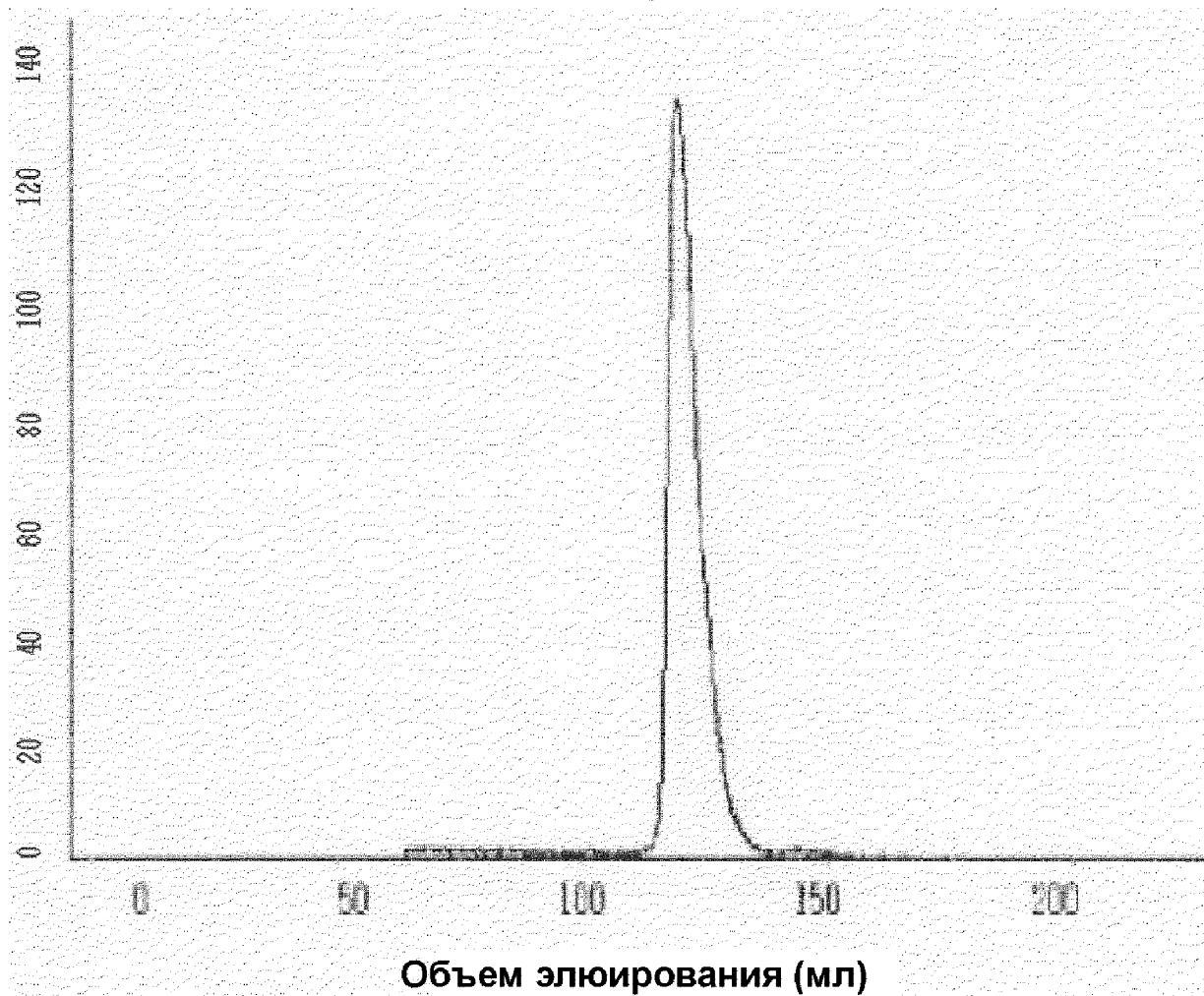
M: Маркер молекулярной массы

Дорожка 1: Fc

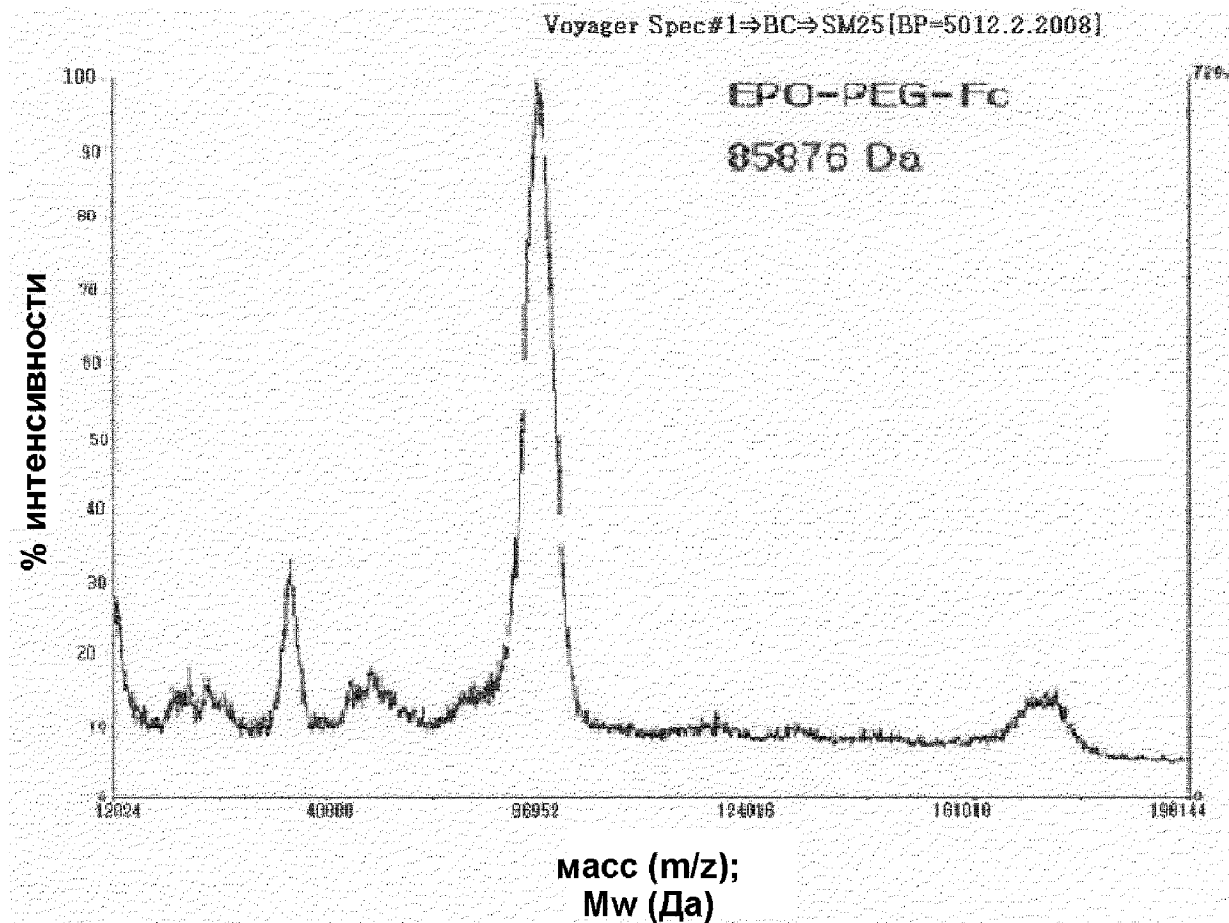
Дорожка 2: Физиологически активный белок

Дорожка 3: Конъюгат "физиологически активный белок - ПЭГ - Fc"

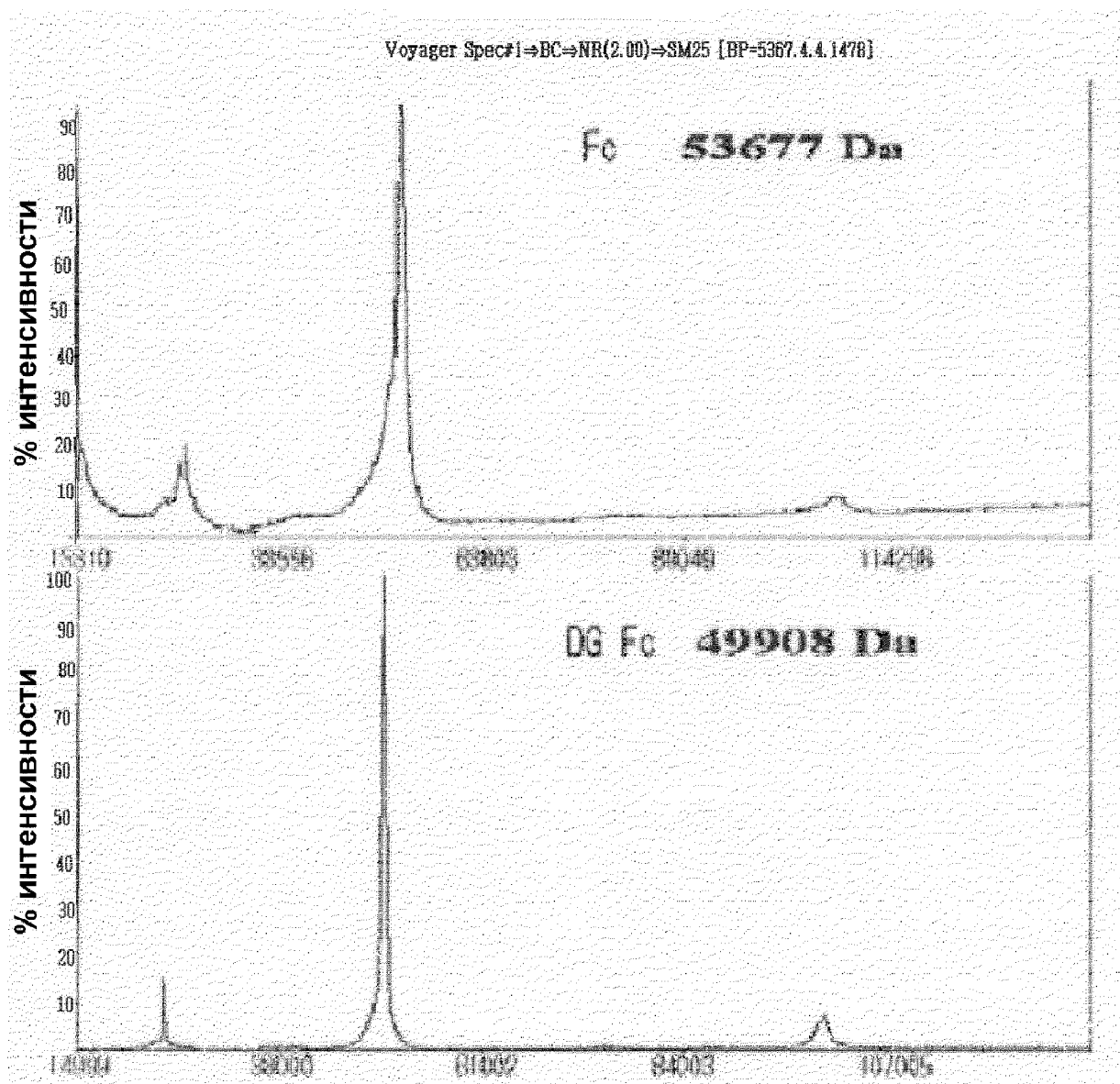
Фиг. 3



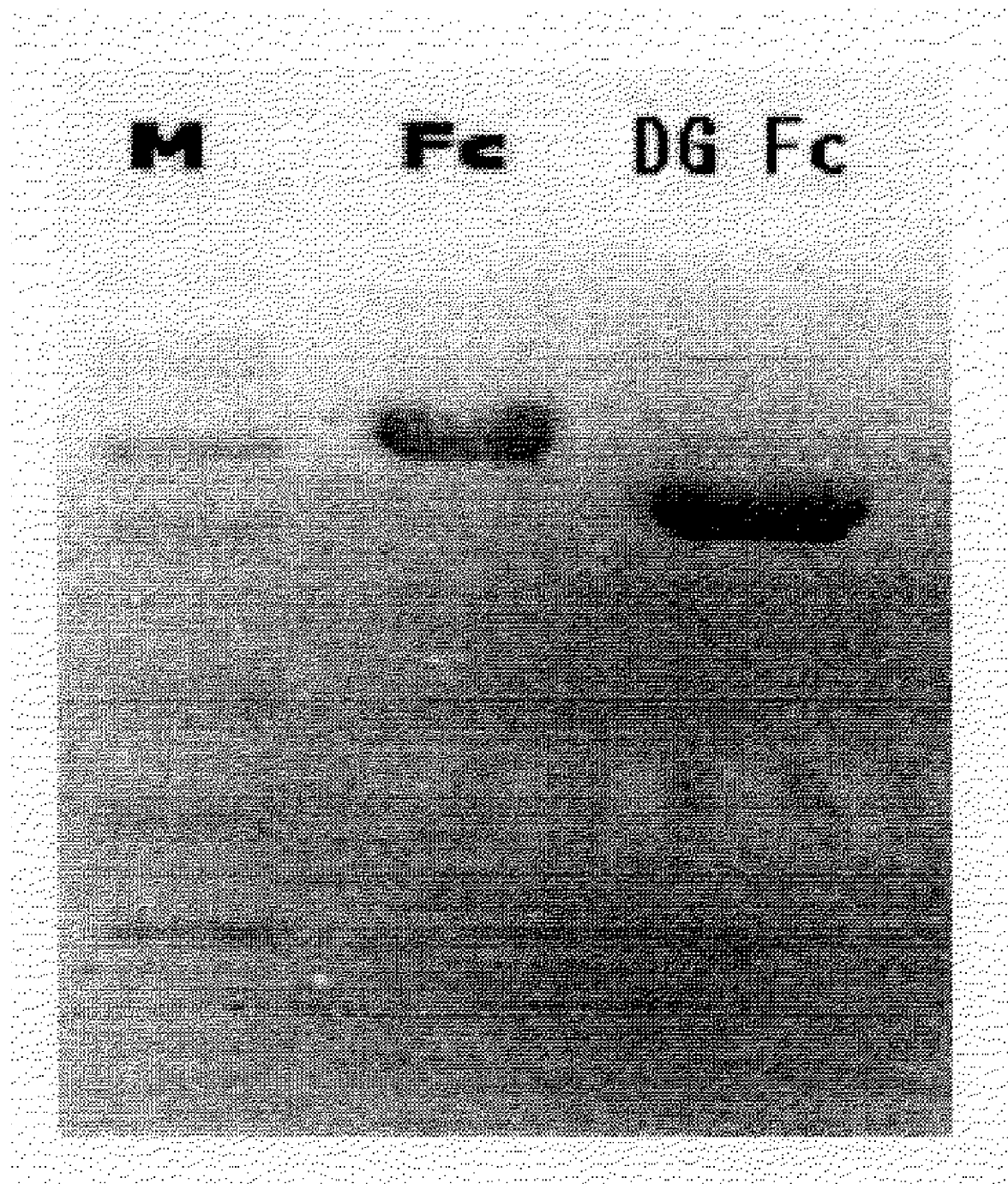
Фиг. 4



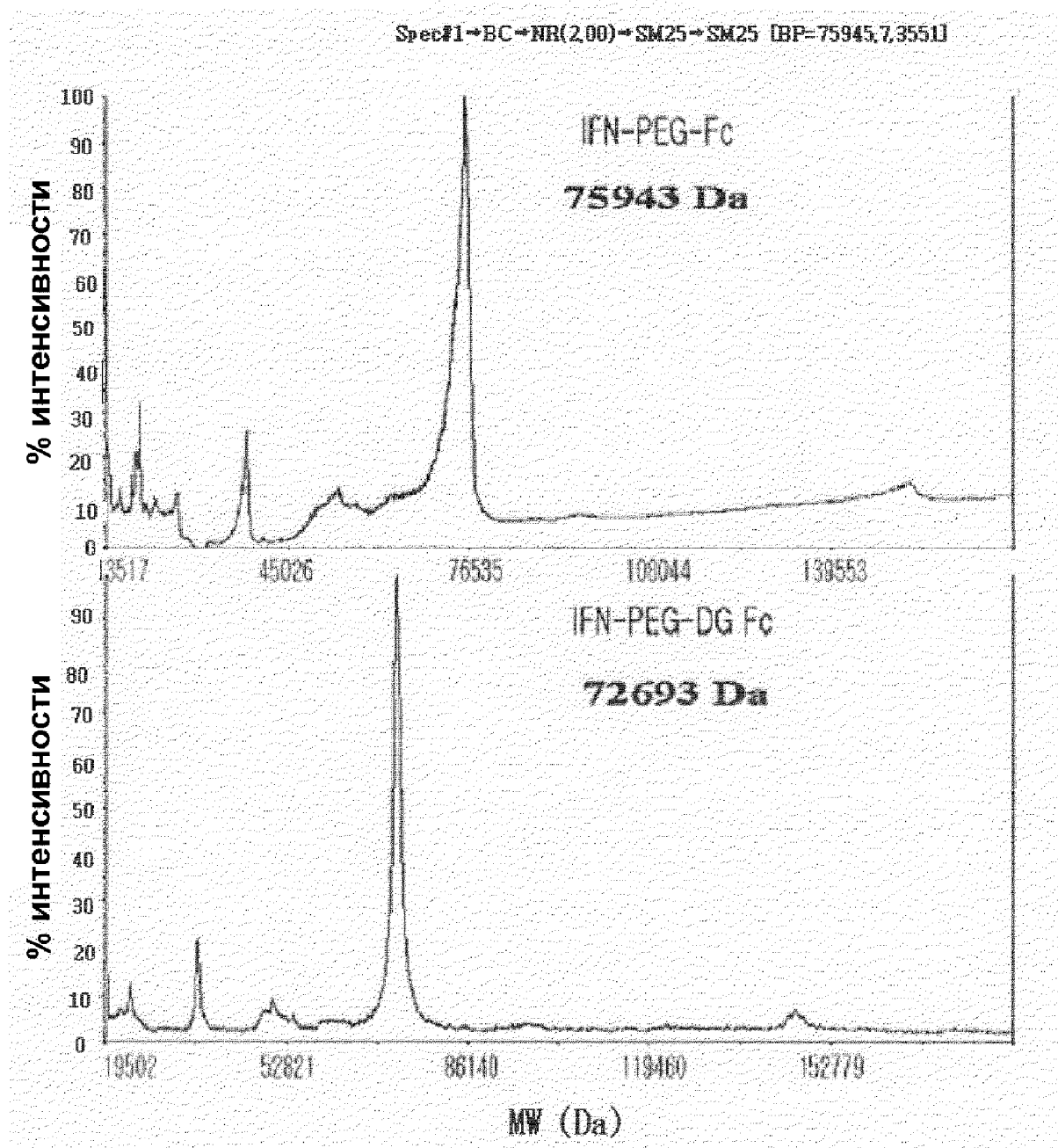
ФИГ. 5



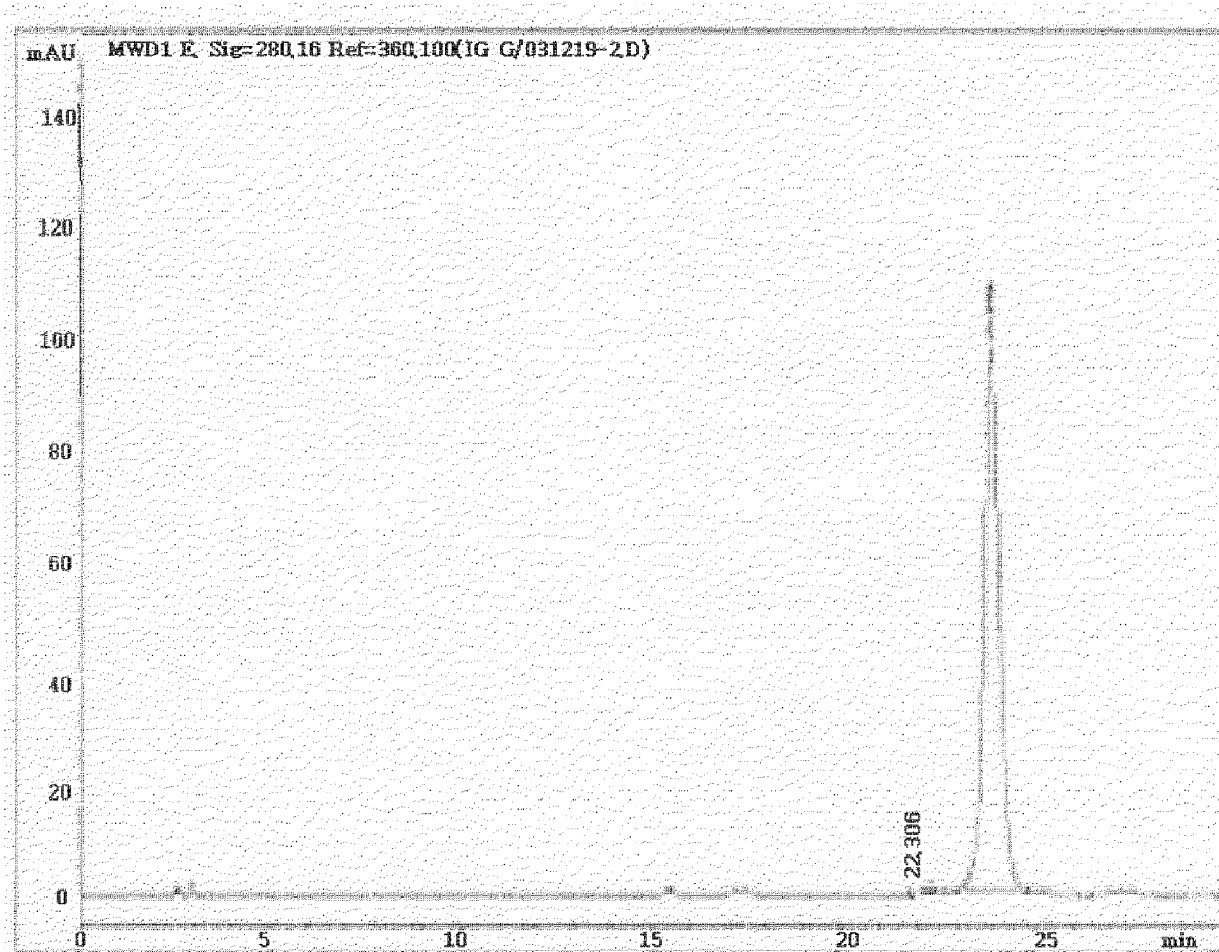
Фиг. 6а



**Фиг. 6b**

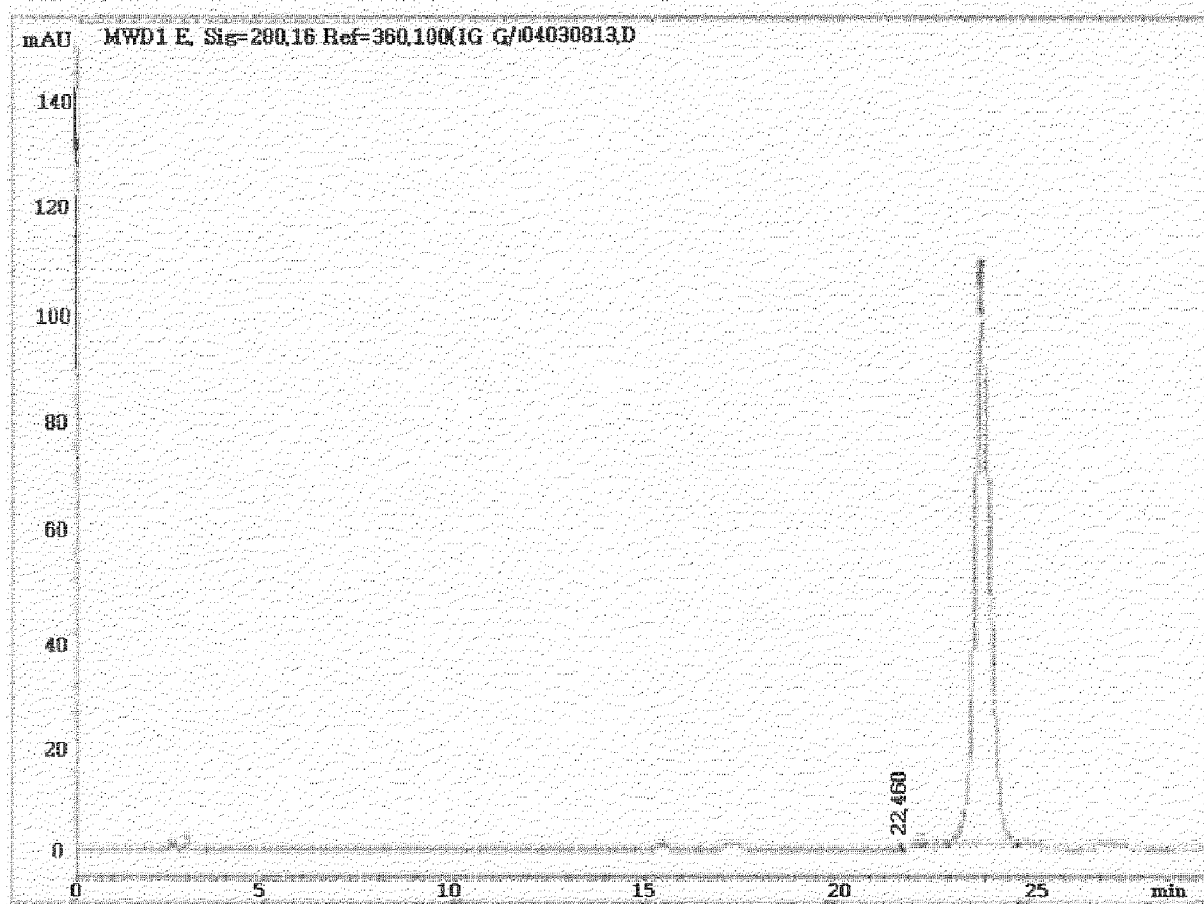


Фиг. 7



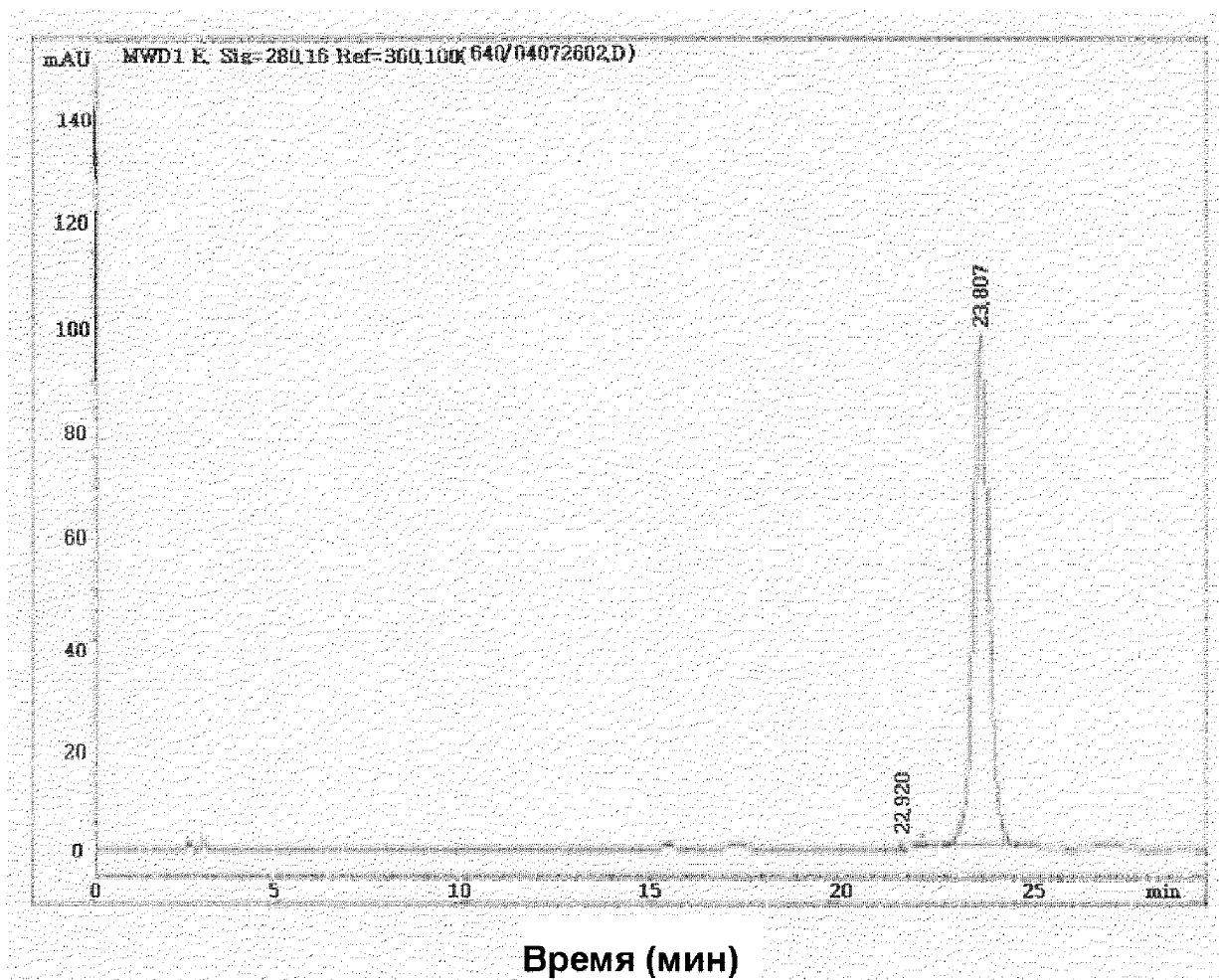
Время (мин)

Фиг. 8а

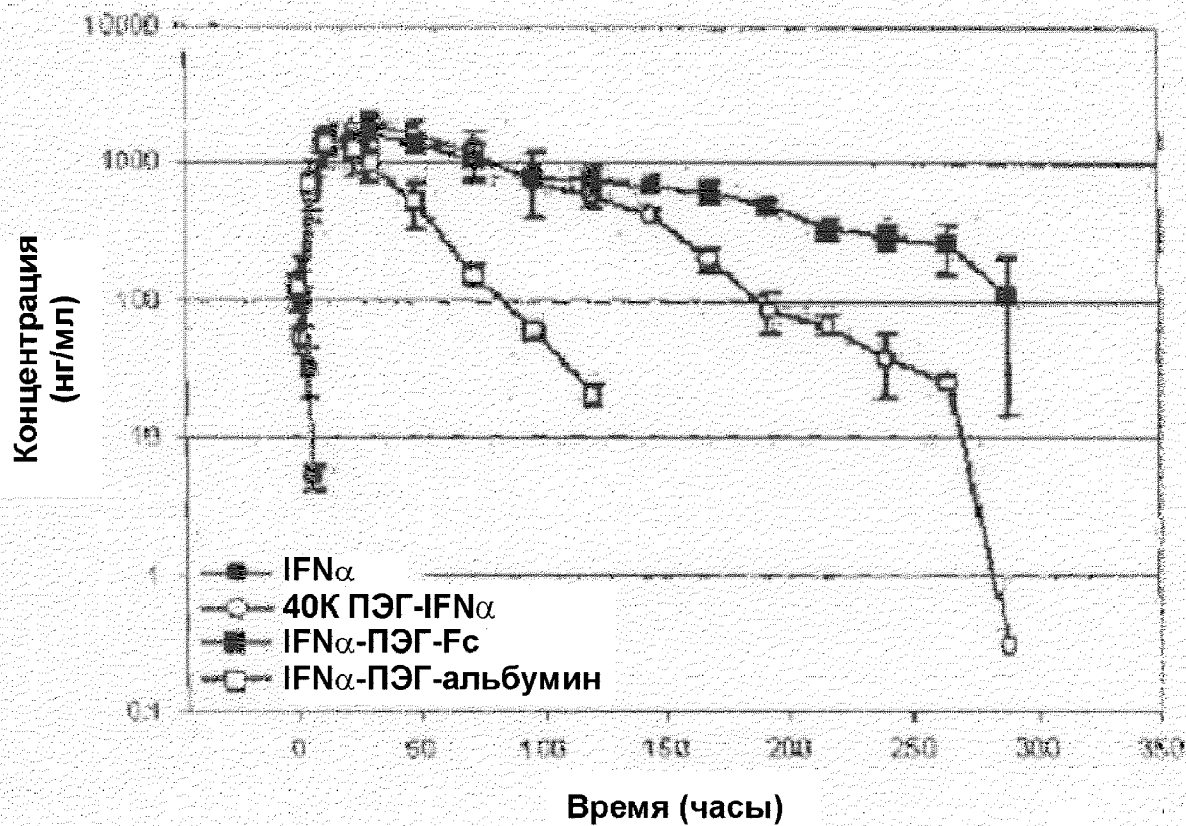


Время (мин)

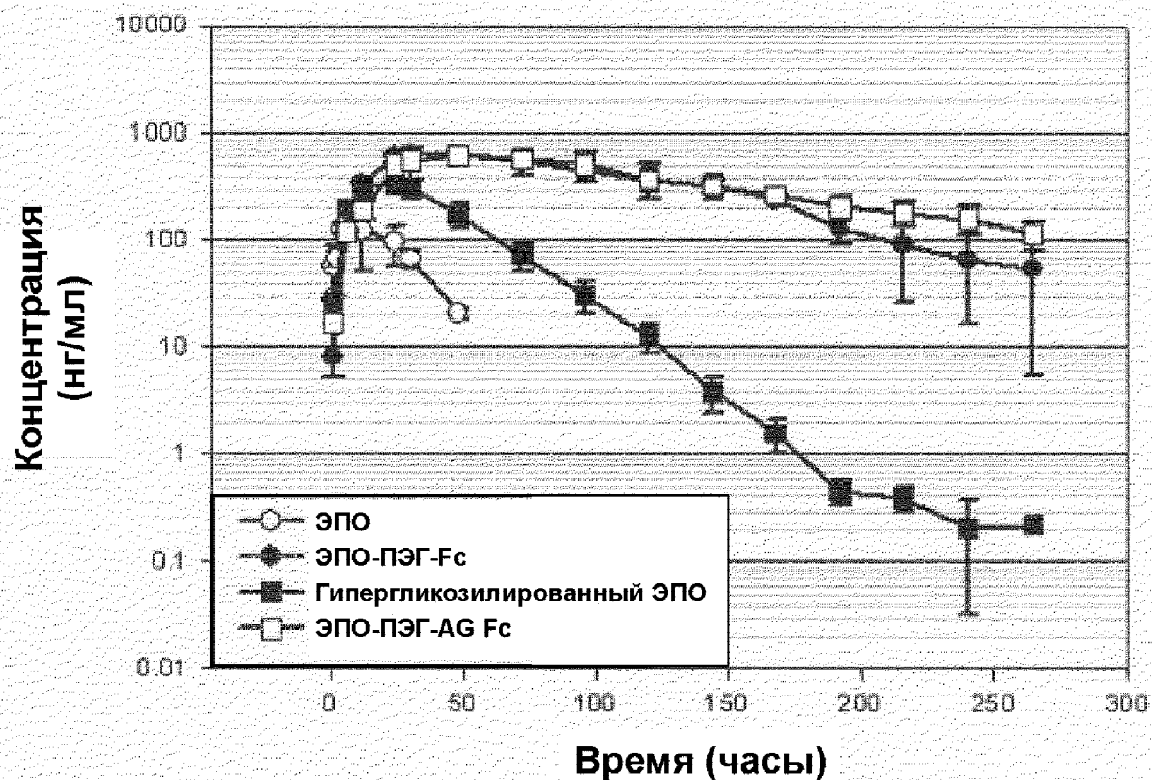
Фиг. 8b



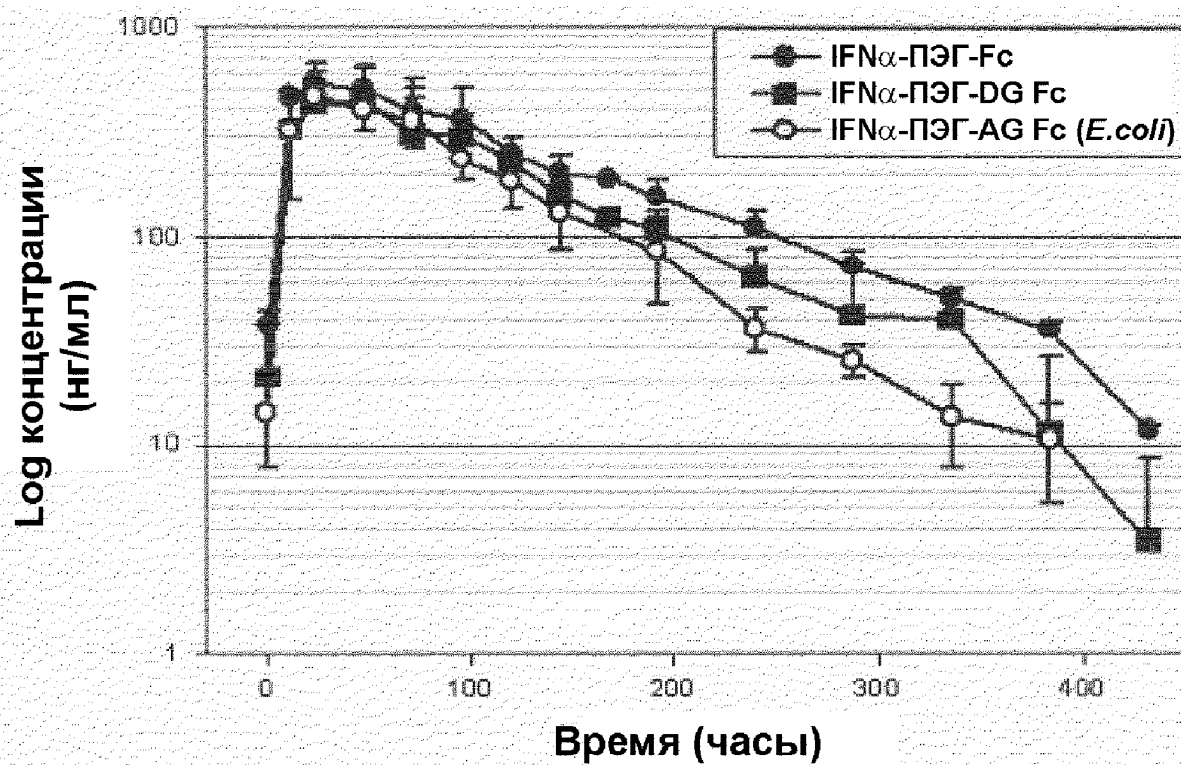
Фиг. 8с



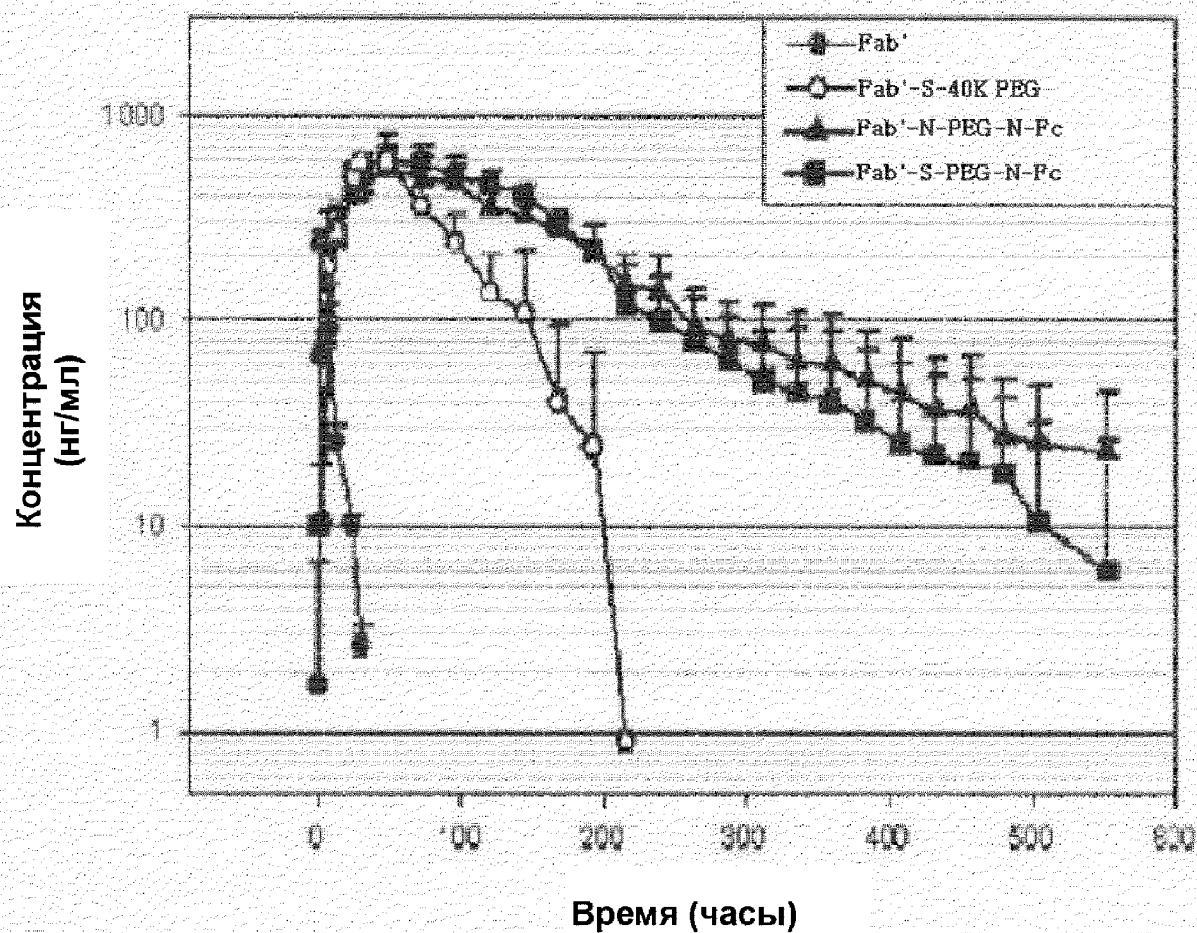
Фиг. 9



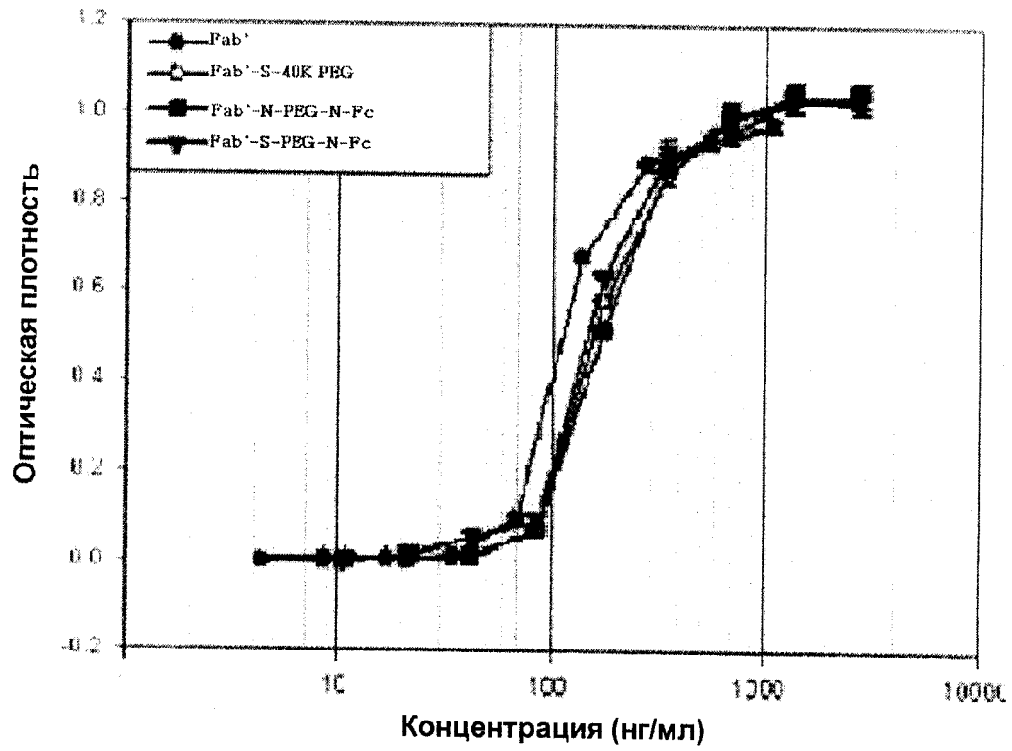
Фиг. 10



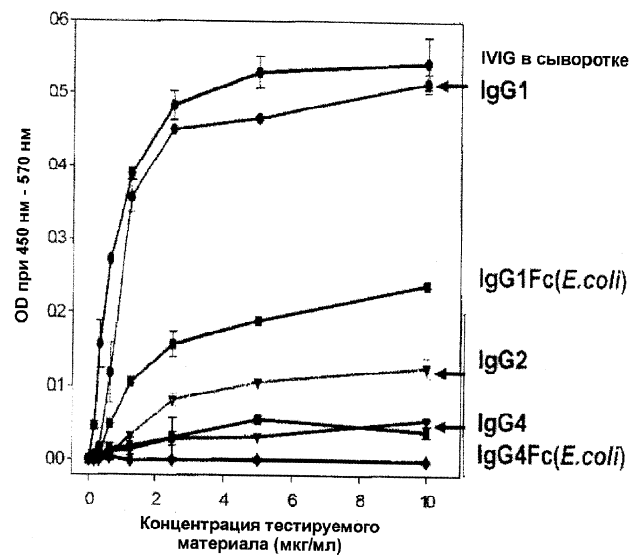
Фиг. 11



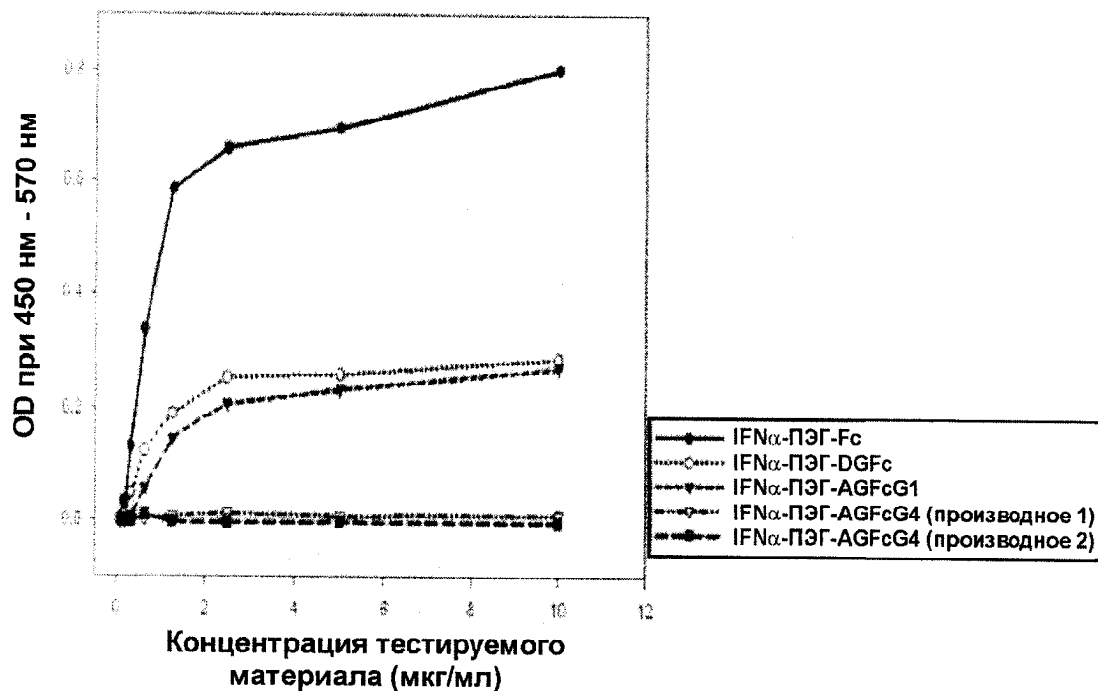
Фиг. 12



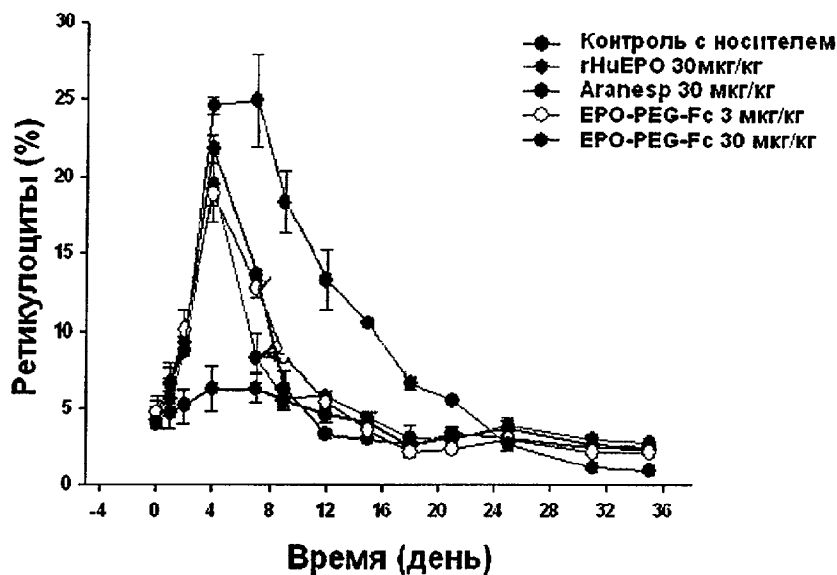
Фиг. 13



Фиг. 14

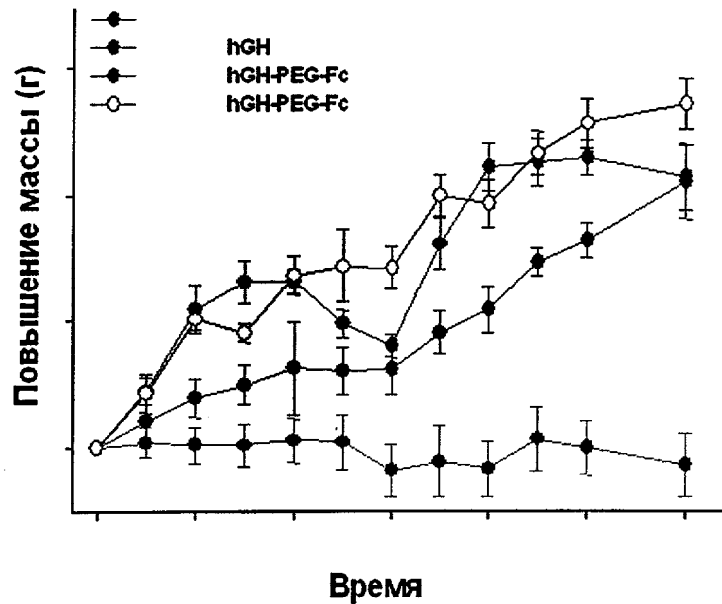


Фиг. 15



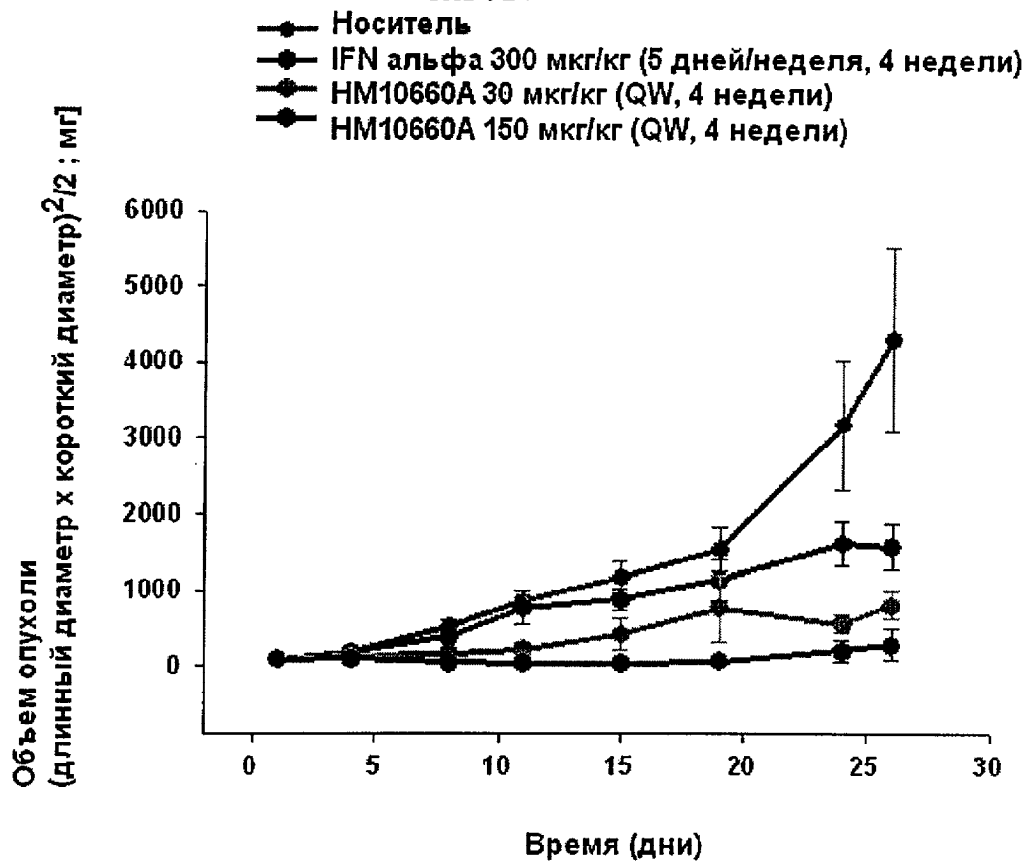
Изменения ретикулоцитов у крыс SD после введения природного ЕРО, высокогликозилированного ЕРО и ЕРО-ПЭГ-Fc по настоящему изобретению

Фиг. 16

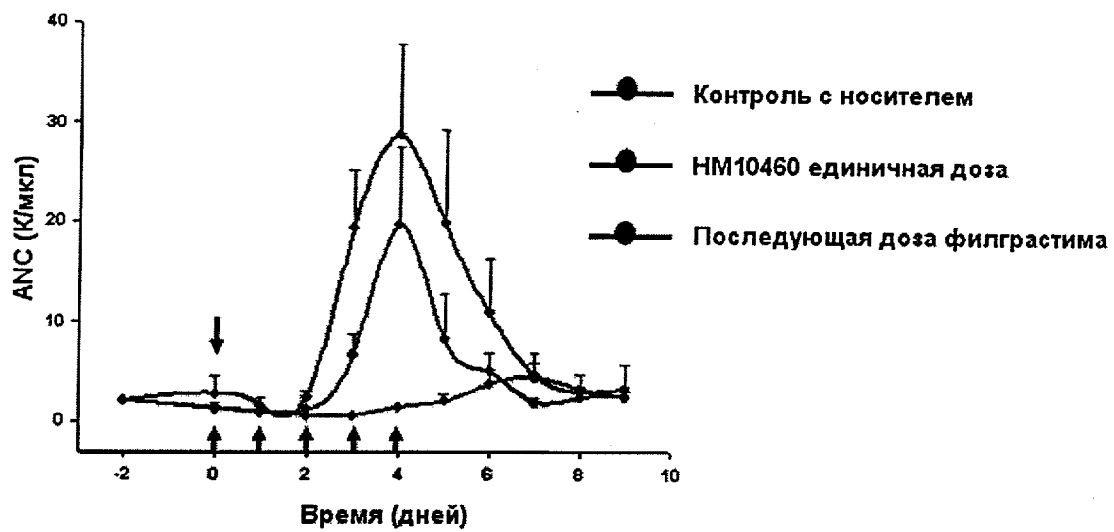


Анализ повышения массы у крыс.

Фиг. 17



Фиг.18



ФИГ. 19